

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



★★★★★

FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

★★★★★



ANNEE 2001

N°118

**ÉTUDE IN-VITRO DES PARAMÈTRES DE  
BACTÉRICIDIE DE DIFFERENTS  
ANTIBIOTIQUES SUR DES SOUCHES  
BACTÉRIENNES D'ORIGINE HOSPITALIÈRE**

**THESE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(DIPLÔME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

**LE 14 NOVEMBRE 2001**

PAR

***M. Mame Sémou Amade DIOUF***

Né le 29 Octobre 1974 à Thiès (SÉNÉGAL)

JURY

**M 42700**

<b>Président :</b>	M. Doudou	BA	: Professeur
<b>Membres :</b>	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	: Professeur
	M. Alioune	DIEYE	: Professeur
	M. Mounirou	CISS	: Professeur
<b>Directeur de thèse :</b>	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	: Professeur

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

=====

## FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE

-----



## *PERSONNEL DE LA FACULTE*

DOYEN .....	M. Doudou	THIAM
PREMIER ASSESSEUR.....	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE
DEUXIEME ASSESSEUR.....	M. Malick	SEMBENE
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS.....	M. Assane	CISSE

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE POUR L'ANNEE UNIVERSITAIRE

2000-2001

\* \* \*

### **PROFESSEURS TITULAIRES**

\* \* \*

M. José Marie	AFOUTOU	Histologie Embryologie
M. Mamadou	BA	Pédiatrie
M. Mamadou	BA	Urologie
M. Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M. Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
M. Fallou	CISSE	Physiologie
M. Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M. Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
M. Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M. Lamine	DIAKHATE	Hématologie
+ M. El Hadj Malick	DIOP	O.R.L.
Mme Thérèse	MOREIRA/DIOP	Médecine Interne I
M. Sémou	DIOUF	Cardiologie
M. Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M. Oumar	GAYE	Parasitologie
M. Mamadou	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M. Momar	GUEYE	Psychiatrie
M. Serigne Magueye	GUEYE	Urologie
M. Nicolas	KUAKUVI	Pédiatrie
M. Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M. Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
+ M. Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie
Mme Mbayang NIANG	NDIAYE	Physiologie
M. Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M. Papa Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
+ M. Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M. Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie

---

+ *Professeur Associé* ; & *Personnel en détachement*  
# *Personnel mis en Disponibilité*

M. Mamadou	SARR	Pédiatrie
& Mme Awa	COLL/SECK	Maladies Infectieuses
M. Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M. Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale
M. Abdourahmane	SOW	Médecine Préventive
M. Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
M. Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
M. Moussa Lamine	SOW	Anatomie
*M. Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M. Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale
M. Pape	TOURE	Cancérologie
M. Alassane	WADE	Ophthalmologie

## *MAITRES DE CONFERENCES AGREGES*

\* \* \*

M. Moussa	BADIANE	Radiologie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neuro-Chirurgie
M. Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
M. Jean Marie	DANGO	Anatomie-Pathologie
M. Abdarahmane	DIA	Anatomie
* M. Massar	DIAGNE	Neurologie
* M. Issakha	DIALLO	Santé Publique
M. Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M. Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
M. El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M. Saïd Norou	DIOP	Médecine Interne II
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Boucar	DIOUF	Médecine Interne I (Néphrologie)
M. Raymond	DIOUF	O.R.L.
M. Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M. Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
Mme Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
Mme Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologie
M. Lamine	GUEYE	Physiologie

---

*\* Associé**& Personnel en détachement*

M. Abdoul Almamy	HANE	Pneumophtisiologie
*M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne I
M. Abdoul	KANE	Cardiologie
M. Victorino	MENDES	Anatomie Pathologie
M. Jean Charles	MOREAU	Gynécologie
*M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Issa	NDIAYE	O.R.L.
M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
M Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Chirurgie
M. El Hadji	NIANG	Radiologie
*M. Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
M. Niama Diop	SALL	Biochimie Médicale
Mme Bineta	SALL/KA	Anesthésie-Réanimation
M. Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M. Moustapha	SARR	Cardiologie
M. Birama	SECK	Pédopsychiatrie
M. El Hassane	SIDIBE	Médecine Interne II
M. Ahmed Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
*M. Pape Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M. Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheickna	SYLLA	Urologie
M. Omar	SYLLA	Psychiatrie
M. Doudou	THIAM	Hématologie

***MAITRES-ASSISTANTS***

\* \* \*

M. El Hadj Amadou	BA	Ophtalmologie
M. Moussa	BA	Psychiatrie
M. Momar Codé	BA	Neurochirurgie
Mme Sokhna	BA/DIOP	Radiologie
M. Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M. El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheikh Ahmed T.	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme Mariama Safiétou KA	CISSE	Médecine Interne II
M. André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie

Mme Anta TAL	DIA	Médecine Préventive
* M. Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M. Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
*M. Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M. Yémou	DIENG	Parasitologie
Mme Elisabeth	DIOUF	Anesthésie-réanimation
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Médecine Interne I (Gastroentérologie)
M. Saliou	DIOUF	Pédiatrie
M. El Hadji Fary	KA	Médecine Interne
M. Assane	KANE	Dermatologie
*M. Mouhamadou	MBENGUE	Médecine Interne I Orthopédique
Mme Coura SEYE	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M. Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies infectieuses
Mme Paule Aïda ROTH	NDOYE	Ophthalmologie
M. Ndaraw	NDOYE	Neurochirurgie
M. Abdoulaye	POUYE	Médecine Interne I
Mme Anne-Aurore	SANKHALE/DIOUF	Chirurgie générale
M. Masserigne	SOUMARE	Maladies infectieuses
M. Abdoulaye	SAMB	Physiologie
Mme Anna	SARR	Maladies infectieuses
M. Doudou	SARR	Psychiatrie
M. Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M. Gora	SECK	Physiologie
Mme Hassanatou TOURE	SOW	Biophysique
M. Abdourahmane	TALL	O.R.L.
M. Alé	THIAM	Neurologie

## ***ASSISTANTS DE FACULTE - ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX***

\* \* \*

Melle Agaïcha Tamdette	ALFIDJA	Physiologie
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
M Alassane	DIATTA	Biochimie Médicale

---

• *Associé*

M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M. Mamadou	DIOP	Anatomie (Cancérologie)
M. Moctar	DIOP	Histologie-Embryologie
M. Saliou	DIOP	Hématologie
Mme Awa Oumar TOURE	FALL	Hématologie
Mme Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Oumar	FAYE	Histologie-Embryologie
M. El Hadj Alioune	LO	Anatomie (Organogénèse)
M. Ismaïla	MBAYE	Médecine Légale
M. Mamadou	MBODJ	Biophysique
M. Oumar	NDOYE	Biophysique
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Kamadore	TOURE	Médecine Préventive
M. Issa	WONE	Médecine Préventive

## ***CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS*** ***DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX***

\* \* \*

Mme Aïssata LY	BA	Radiologie
Mme Marième GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M. Maguette	BA	Chirurgie Générale
M. Mamadou Diarra	BEYE	Anesthésie-Réanimation
Mme Elisabeth FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
M. Ahmadou	DEM	Cancérologie
Melle Ndèye Méry	DIA	Maladies Infectieuses
M. Saïdou	DIALLO	Médecine Interne I
M. Oumar	DIARRA	Chirurgie Générale
M. Charles Bertin	DIEME	Orthopédie-Traumatologie
M. Rudolph	DIOP	Stomatologie
Mme Fatou SENE	DIOUF	Neurologie
M Papa Ahmed	FALL	Urologie
M. Oumar	KANE	Anesthésie-Réanimation
* M. Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
Mme Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M Philippe Marc	MOREIRA	Gynécologie obstétrique
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M. Moustapha	NDIAYE	Neurologie

---

• *Associé*

Mme Ndèye Maïmouna	NDOUR	Médecine Interne II
*M. Abdou	NIANG	Néphrologie
Mme Suzanne Oumou	NIANG	Dermatologie
M Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
Mme Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie
M. Silly	TOURE	Stomatologie

## ***ATTACHES CHEFS DE CLINIQUE***

\* \* \*

M. Oumar	BA	Pneumophtisiologie
M. Mamadou	COUME	Médecine Interne I
M. Mor	NDIAYE	Pneumophtisiologie

## ***ATTACHES - ASSISTANTS***

\* \* \*

M <sup>me</sup> Nafissatou NDIAYE	BA	Anatomie-Pathologie
M <sup>elle</sup> Fatou	DIALLO	Biochimie Médicale
M. Papa	NDIAYE	Médecine Préventive

---

\* *Associé*

## II - PHARMACIE

### ***PROFESSEURS TITULAIRES***

\* \* \*

M. Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M. Alioune	DIEYE	Immunologie
* M. Babacar	FAYE	Pharmacologie-Pharmacodynamie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
* M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
* M. Oumar	NDIR	Parasitologie

### ***MAITRES DE CONFERENCES AGREGES***

\* \* \*

M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
* M Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
Mme Aïssatou GAYE	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique

### ***MAITRES-ASSISTANTS***

\* \* \*

Melle Issa Bella	BA	Parasitologie
* M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie
M. Yérin Mbagnick	DIOP	Chimie analytique
Mme Rita BEREHOUNDOUGOU	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

---

\* *Associé*

## ASSISTANTS

\* \* \*

M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M. William	DIATTA	Botanique
M <sup>elle</sup> Thérèse	DIENG	Parasitologie
M. Macoura	GADJI	Hématologie
M <sup>elle</sup> Edwige	GOMIS	Pharmacognosie
M. Ahmédou Bamba K. & M. Djibril	FALL FALL	Pharmacie Galénique Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Mamadou	FALL	Toxicologie
M. Modou	LO	Botanique
*M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie
Mme Maguette Dème SYLLA	NIANG	Immunologie-Biochimie
Mme Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
*M. Elimane Amadou & M. Alassane	SY WELE	Chimie Générale et Minérale Chimie Physique

## ATTACHES

\* \* \*

Mme Amy THIAM	FALL	Chimie Analytique
M Mor	GUEYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Madièye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Modou Oumou	KANE	Physiologie Pharmaceutique
M. Sarra	NGOM	Pharmacie Galénique

---

\* *Assistant Associé*  
& *En Stage*

# III - CHIRURGIE DENTAIRE

## **PROFESSEURS TITULAIRES**

\* \* \*

M. Ibrahima <sup>me</sup> M <sup>me</sup> Ndioro	BA NDIAYE	Pédodontie-Prévention Odontologie Préventive et Sociale
--	--------------	--

## **MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

\* \* \*

* M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
M <sup>me</sup> Charlotte FATY	NDIAYE	Chirurgie Buccale
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie

## **MAITRES-ASSISTANTS**

\* \* \*

M. Daouda	CISSE	Odontologie Préventive et Sociale
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
M <sup>me</sup> Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M <sup>elle</sup> Fatou	GAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Abdou Wahab	KANE	Odontologie Conservatrice Endodontie
*M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
M <sup>elle</sup> Soukèye DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M. Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie

## **ASSISTANTS DE FACULTE**

\* \* \*

M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
M <sup>me</sup> Aïssatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
M <sup>me</sup> Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M. Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
M <sup>me</sup> Adam Marie A. SECK	DIALLO	Parodontologie
*M. Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire

---

\* *Maître Assistant - Associé*

*M. Malick	MBAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
M Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Paul Dédé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
M. Farimata Youga	SARR	Matières Fondamentales
M. Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

## ***ATTACHES***

\* \* \*

M. Babacar	FAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Malick	FAYE	Pédodontie-Orthodontie
M. Mohamed	SARR	Odontologie Conservatrice Endodontie
M <sup>me</sup> Fatoumata DIOP	THIAW	Odontologie Conservatrice Endodontie

---

\* *Assistant Associé*

# Dedicações

## *Je dédie ce travail*

- Au **Tout Puissant et Miséricordieux**, Allah (SWT), pour ses innombrables grâces.
- A son **prophète Mouhamed** ( SAW) l' élu des élus, le meilleur des guides.
- A mes **grands parents** in memorium que la terre leurs soit légère et que le Miséricordieux les accueille dans son paradis.
- **A mon père** pour son engagement sans faille dans l'éducation de ses enfants. Aujourd'hui je me souviens encore de cette émouvante matinée d'octobre 1979 où main dans la main tu m'amenaï pour la première fois à l'école. Puisse ce modeste travail témoigner de mon affection et de ma reconnaissance.
- **A ma mère**, ce diplôme et tous les autres sont le fruit de tes innombrables sacrifices. Toi qui n'a ménagé aucune énergie pour mettre tes enfants sur la bonne voie. Nous te devons tout. Que le Tout puissant nous accorde santé et longévité pour que nos sacrifices ne soient pas vains.
- A mon frère aîné **Coumba Ndofféne Diouf**, merci d'avoir balisé le chemin.
- A mes **jeunes frères et sœurs**, restons ensemble et faites mieux que moi !
- A tous mes **oncles et tantes** ainsi qu'à leurs familles.

- A **tonton Eugène, tata Margo** et leurs enfants à la SICAP Sacré Cœur 2 (une seconde maison pour moi).
- A tous **mes amis** qui se reconnaîtront, merci pour votre compréhension et votre soutien qui me sont si précieux. Que le Tout Puissant éloigne le mal faisant « cheytane » de nos relations privilégiées et qu'il les fasse perpétuer à travers nos enfants.
- **Aux familles** Ndiaye à la cité Fadia, Faye à Bambey, Lô en France, Diop à Castors, Diouf et Ba au Mbode 1 à Guédiawaye.
- A ma **tante Rokhaya Faye**, son époux, mes cousins et cousines.
- A **tonton Waly Faye** et sa famille aux Parcelles assainies, merci encore.
- Au **Dr Ndèye Aminata Gormak Mané Ndaw** pour m'avoir grandement ouvert les portes de son officine et de sa maison ainsi que tous ses employés pour leur courtoisie sans faille.
- **Aux Docteurs** Abdoulaye Sy, Modou Oumy Kane, Mor Guéye et Bara Ndiaye pour leurs amitiés et leurs conseils éclairés.
- A tous mes **camarades de la promotion** des « pharmaciens de l'an 2000 » pour les moments inoubliables vécus ensemble.
- **Aux contribuables sénégalais** pour avoir si gracieusement contribué à ma scolarité à travers bourses et subventions.

# Remerciements

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie tout ceux qui ont aidé à la réalisation de ce travail, en particulier le personnel du laboratoire de bactériologie et virologie de l'hôpital Aristide le Dantec.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit du Dr Djamal Abdoul Ahad Ndao pour m'avoir initié à la méthode de travail.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection.

CHU: Centre Hospitalier Universitaire.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

HALD : Hopital Aristide Le Dantec.

ICS : Internationnal Collaborative Study.

NCCLS : National Commitee For Clinical Laboratory Standards (USA).

SARM : *Staphyloccocus aureus* Methicilin resistant.

Tampon P : Tampon phosphate.

UFC : Unité Formant Colonie.

UV : Ultra violet.

A nos maîtres  
et juges

*A notre Maître et Président de Jury*  
*Le Professeur Doudou Ba*

Nous sommes profondément touchés par l'honneur que vous nous faites en présidant ce jury de thèse.

Vos qualités intellectuelles, humaines et votre amour pour le travail bien fait nous inspirent une grande admiration.

Nous avons été fortement marqués durant toutes nos études par la qualité de votre enseignement enrichissant et toujours dispensé avec clarté et méthode.

Nous vous prions de bien croire à notre profonde gratitude et notre sincère reconnaissance.

*A notre Maître et directeur de thèse*  
*Le Professeur Cheikh Saad-bouh Boye*

Cher professeur l'occasion s'offre enfin à nous pour vous témoigner toute notre reconnaissance.

Vous nous avez confié ce travail et vous avez donné les moyens de le faire convenablement. L'abord facile et la grande disponibilité qui vous caractérisent nous ont permis de grandement profiter de vos connaissances et compétences scientifiques émérites. Vous resterez pour nous un modèle à suivre. Nous espérons avoir mérité la confiance placée en nous.

Professeur une fois encore merci pour tout.

*A notre Maître et juge le Professeur*

*Alioune Dieye*

Nous avons été touchés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Vos qualités professionnelles et humaines nous ont toujours impressionnés. Votre riche enseignement est dispensé avec une grande pédagogie.

Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre fidélité à votre enseignement.

*A notre Maître et juge le professeur*

*Mounirou Ciss*

Avec spontanéité, vous avez aménagé un emploi du temps chargé pour siéger dans ce jury.

C'est un grand honneur que vous nous faites. Vous représentez pour nous un modèle de droiture et de rigueur dans le travail. Qualités que vous essayez sans relâche d'inculquer à des générations de pharmaciens. Qualités du reste indispensables à un exercice consciencieux de la profession.

Soyez en vivement remercié.

*« Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation ».*

## SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>II. GENERALITES</b>	<b>3</b>
<b>A. LES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>3</b>
1. Définition	3
2. Classification	3
a) Les bêta-lactamines	3
b) Les macrolides, lincosamides, streptogramines (MLS)	4
c) Les aminosides	5
d) Les cyclines	5
e) Les phénicolés	5
f) Les quinolones	6
g) Les sulfamidés et diaminopyridine	6
h) Les glycopeptides	6
i) Les autres antibiotiques	7
3. Mécanismes d'action	7
a) Les bêta-lactamines	7
b) Les aminosides	7
c) Les quinolones	8
d) Les macrolides	8
4. Mécanismes de résistance	8
a) Résistance par inhibition enzymatique de l'antibiotique	8
b) Résistance par altération de la cible bactérienne	9
c) Résistance par altération de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie	9
<b>B. RAPPELS SUR LES METHODES D'ETUDE DES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>10</b>
1. Bactériostase	10
a) Définition	10
b) Caractérisation	11
c) Méthodes de détermination de la CMI	11
d) Intérêts, problèmes et limites de la détermination de la CMI	12
2. Bactéricidie	13
a) Définition	13
b) Caractérisation	14
c) La CMB	14
d) Les cinétiques de bactéricidie	16
3. Facteurs techniques modifiant la CMI, la CMB et les cinétiques de bactéricidie	18
a) Influence du milieu de culture	18
b) Influence du récipient	19
c) Autres facteurs influencants	20
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>22</b>
<b>A. SOUCHES BACTERIENNES ET ANTIBIOTIQUES</b>	<b>22</b>
1. Souches à tester	22
2. Souches de référence	22
3. Antibiotiques de l'étude	23

<b>B. MATERIEL ET REACTIFS</b>	<b>24</b>
1. Materiel	24
2. Réactifs	24
<b>C. METHODES</b>	<b>25</b>
1. Préparation des solutions mères d'antibiotiques	25
a) Réactifs	25
b) Protocole	25
2. Préparation de l'inoculum	26
3. Ensemencement des microplaques et lecture	27
<b>D. CONTROLE DE QUALITE</b>	<b>28</b>
<b>IV. RESULTATS ET COMMENTAIRES</b>	<b>29</b>
A. Streptococcus pneumoniae	29
B. Staphylococcus aureus	32
C. Staphylococcus spp (non aureus)	35
D. Flavobacterium odoratum	38
E. Pseudomonas aeruginosa	41
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>44</b>
A. ACTIVITE BACTERICIDE DES BETALACTAMINES	44
B. ACTIVITE BACTERICIDE DES MACROLIDES	61
C. ACTIVITE BACTERICIDE DE LA GENTAMICINE	61
D. ACTIVITE BACTERICIDE DE LA CIPROFLOXACINE.	63
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>64</b>
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>67</b>

Introduction

# I. INTRODUCTION

En clinique humaine l'utilisation efficace des antibiotiques requiert l'étude préalable in-vitro du comportement des souches bactériennes responsables d'infections vis à vis de différentes molécules d'antibiotiques.

Très souvent, l'antibiogramme de la souche bactérienne isolée suffit à lui seul pour mettre en route une antibiothérapie efficace car permettant de choisir sur un groupe d'antibiotiques testés le plus efficace sur la bactérie isolée.

Cependant lors d'infections graves telles que les septicémies ou celles survenant sur un terrain immunodépressif, le traitement requiert alors l'utilisation d'antibiotiques fortement bactéricides, donc une étude plus détaillée de l'activité des antibiotiques supposés être efficaces.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude qui au delà de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) vise à déterminer la cinétique de bactéricidie d'antibiotiques souvent utilisés au CHU le Dantec l'étude porte sur des cocci Gram positif et bacilles Gram négatifs isolés sur des malades du CHU.

La méthode utilisée est celle de dilution en milieu liquide sur microplaque.

Dans la première partie de notre travail nous nous proposerons de faire des rappels bibliographiques liés à l'antibiothérapie et aux effets bactéricides des antibiotiques, ensuite nous exposerons le matériel et les méthodes utilisés pour enfin exposer les résultats et les discuter.

Généralités

## II. GENERALITES

### A. LES ANTIBIOTIQUES

#### 1. Définition (1, 27)

Les antibiotiques sont des substances chimiques, produites par des micro-organismes ou obtenues par hémi-synthèse ou synthèse totale, douées d'une activité antibactérienne. Ils agissent à l'échelon moléculaire sur une cible spécifique (entravant en général un processus vital). L'activité antibactérienne va se manifester par une destruction des bactéries ou une inhibition de leur multiplication.

#### 2. Classification (1,3,7)

##### a) Les bêta-lactamines

C'est l'une des familles d'antibiotiques les plus prolifiques. Elles contiennent dans leur structure un noyau bêta-lactame responsable de l'activité antibactérienne.

On distingue trois familles :

Les pénicillines

Les céphalosporines

Les monobactams

##### ◆ Les pénicillines

Leur structure comprend un cycle bêta-lactame accolé à un cycle thiazolidine.

Selon la nature des substituants greffés à ce noyau on distinguera dans ce groupe entre autres :

-Les pénicillines naturelles (groupes G et V)

-Les pénicillines du groupe A (aminopénicillines) avec l'amoxicilline et l'ampicilline.

-Les pénicillines du groupe M (isooxazolylpénicillines) telles que oxacilline et la flucloxacilline.

- Les carboxypenicillines avec la carbenicilline et la ticarcilline.
- Les acyluréidopénicillines (pipéracilline, azlocilline, mezlocilline)
- Les amidinopénicillines (pivmécillinam)

◆ Les céphalosporines

Les céphalosporines ont pour noyau commun l'acide 7-amino céphalosporanique.

La classification des céphalosporines repose davantage sur leur spectre d'action de plus en plus large que sur une structure chimique commune. On les répertorie de façon quelque peu arbitraire en générations successives:

- 1<sup>ère</sup> génération : céfadroxyl, céfaloridine, céfalotine, céfaprime, céfazoline, céfradine, céfalexine.
- 2<sup>ème</sup> génération : céfamandole, céfatrizine, céfuroxime, céfotiam, cefoxitine, céfaclor, céforadine.
- 3<sup>ème</sup> génération : ceftriaxone, céfopérazone, latamoxef, ceftazidime, cefsulozine, céfotetan.
- 4<sup>ème</sup> génération : cefépime, cefpirome

◆ Les monobactames

Les monobactames sont des bêta-lactames monocycliques, le plus utilisé en thérapeutique est l'aztreonam. Son spectre est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies.

**b) Les macrolides, lincosamides, streptogramines (MLS)**

Les premiers macrolides sont d'origine naturelle (érythromycine, spiramycine, trioléandomycine). Afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques des dérivés semi-synthétiques de l'érythromycine ont été synthétisés (roxithromycine, clarithromycine, dirithromycine, azithromycine)

Les lincosamides (clindamycine, lincomycine) et les streptogramines ou synergistines (virginiamycine, pristinamycine) sont de molécules apparentées aux macolides. Le spectre des MLS couvre habituellement les bactéries à Gram

positif, les cocci à Gram négatif, les bacilles à Gram négatifs anaérobies et des bactéries intracellulaires telles que *Legionella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*.

### c) Les aminosides

Les premiers aminoglycosides découverts ont été des molécules naturelles produites par des souches de *Streptomyces* ( tobramycine) ou d' *Actinomyces* (gentamicine, sisomicine). A partir de ces dérivés naturels, des produits semi-synthétiques (amikacine, isépamicine, nétilmicine) ont été conçus dans le but d'obtenir des molécules insensibles à l'inactivation par les bactéries devenues résistantes aux aminoglycosides naturels, mais aussi de diminuer la toxicité des composés parents.

Les aminosides se classent en trois grands groupes :

1<sup>ère</sup> génération : streptomycine, néomycine, kanamycine...

2<sup>ème</sup> génération : gentamicine, amikacine, tobramicine...

3<sup>ème</sup> génération : netilmicine

### d) Les cyclines

Leur activité antibiotique est uniquement bactériostatique. Elles voient leur usage limité aujourd'hui par l'émergence de résistances.

Sur la base de leur caractéristiques pharmacocinétiques (demi-vie), on distinguera les cyclines :

de première génération : tétracycline, chlortétracycline, oxytétracycline, déméclocycline

de deuxième génération: doxycycline, minocycline.

### e) Les phénicolés

Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, ils sont porteurs d'un groupement phényle substitué. Ils ont un large spectre et une bonne pénétration dans le système nerveux central. Mais leur usage est actuellement limité par leur toxicité médullaire. A l'heure actuelle, seuls le chloramphénicol et le thiamphénicol sont utilisés en clinique.

### **f) Les quinolones**

Elles peuvent être scindées en deux groupes :

- Les anciennes quinolones : leur spectre est limité aux bacilles Gram négatifs essentiellement entérobactéries. elles sont destinées au traitement peros des infections urinaires. Les molécules utilisées sont les acides nalidixique, oxolinique, pipémidique et piromidique.
- Les nouvelles quinolones présentent une activité plus intense du fait de leur spectre plus élargi et de leur meilleure diffusion tissulaire. Nous avons dans ce groupe; les dérivés fluorés tels que la ciprofloxacine, la pefloxacine et la norfloxacine. La rosoxacine n'est pas fluorée.

### **g) Les sulfamidés et diaminopyridine**

Les sulfamidés et diaminopyridines agissent au niveau d'étapes successives de la synthèse de l'acide folique, les seconds étant des potentialisateurs de l'activité des premiers. Ils bloquent ainsi la synthèse des acides nucléiques car l'acide folique, est un cofacteur de la synthèse ultérieure des bases puriques et Pyrimidiques.

Les sulfamidés se distinguent par leur demi-vie plasmatique. On les classera en dérivés à demi-vie :

- courte (< 10 heures) : sulfacarbamide, sulfisomide, sulfadimidine, sulfafurazol.
- moyenne (10 - 20 heures) : sulfaméthoxazole, sulfadiazine, sulfaphénazol.
- longue (> 20 heures) : sulfamérazine, sulfadiméthoxine, sulfapérazine
- ultralongue (> 100 heures) : sulfadoxine.

### **h) Les glycopeptides**

Ce sont des antibiotiques bactéricides qui agissent en inhibant la biosynthèse de la paroi. Dans ce groupe on retrouve la vancomycine et la teicoplanine. Les glycopéptides sont actifs sur les bactéries Gram positif.

### **i) Les autres antibiotiques**

D'autres antibiotiques comme les polymyxines l'acide fusidique et la bacitracine sont aussi utilisés en thérapeutique humaine.

## **3. Mécanismes d'action (1, 3, 11, 20)**

Ici nous nous intéresserons aux processus moléculaires bactéricides des antibiotiques de notre étude.

### **a) Les bêta-lactamines**

Les bêta-lactamines agissent sur les bactéries en interférant avec le métabolisme de la paroi cellulaire. Ainsi les bêta-lactamines inhibent les stades finaux de la formation d'une macromolécule, le peptidoglycane, principal constituant structural de cette paroi. Les conséquences cellulaires de cette inhibition sont, l'arrêt de la croissance, des changements morphologiques et souvent la bactéricidie avec lyse. Le mécanisme d'action des bêta-lactamines passe par une fixation sur des récepteurs protéiques de la membrane appelés PLP (Protéine Liant la Pénicilline) qui sont impliqués dans la formation des ponts peptidiques du peptidoglycane. Cette fixation déclenche les systèmes autolytiques bactérien entraînant la lyse de leur paroi.

### **b) Les aminosides**

Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules largement employées en thérapeutique dans le traitement des infections bactériennes sévères. Les aminosides ont des effets diversifiés qui s'exercent sur un certain nombre de cibles cellulaires (ribosomes principalement), ces effets sont dits pleiotropiques.

Les principaux modes d'action des aminosides sont les suivants :

- Altération de la synthèse protéique par :
  - Inhibition de la traduction dans ces différentes phases (initiation, élongation, terminaison).
  - Induction d'erreur de traduction.

- Interférence avec le système de transport des électrons.
- Altération des enveloppes bactériennes.
- Altération de la synthèse de l'ADN.
- Dégradation de l'ARN.

### **c) Les quinolones**

Les quinolones agissent en bloquant la synthèse de l'ADN bactérien. Ce blocage passe par une inhibition de l'ADN gyrase, enzyme assurant le surenroulement négatif de l'ADN bactérien. Le chromosome bactérien est normalement surenroulé négativement. La modification de la tension introduite par les quinolones va altérer un certain nombre de fonctions vitales, dont la réplication, la transcription, la recombinaison et la stabilité des plasmides. La perturbation de l'expression des gènes qui va en résulter pourrait entraîner une cascade d'évènements cellulaires pouvant conduire à des divisions cellulaires prématurées, tardives, ou bien totalement inhibées.

### **d) Les macrolides**

Les macrolides se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens, au niveau du site P. Ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNtr depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique. Les macrolides exercent une activité bactériostatique, qui peut devenir bactéricide à dose suffisante.

## **4. Mécanismes de résistance (1, 34, 35, 36, 41, 42)**

Les mécanismes de résistance décrits à l'heure actuelle peuvent être classés en 3 principales catégories :

### **a) Résistance par inhibition enzymatique de l'antibiotique**

Ce mode de résistance implique l'inactivation de l'antibiotique par un enzyme bactérien. C'est l'exemple des bêta-lactamases, enzymes produits par certaines bactéries, capables d'inhiber les bêta-lactamines par hydrolyse de leur cycle bêta-lactame. Les bêta-lactamases sont le plus souvent codées par des plasmides.

Les plus grands producteurs de bêta-lactamases sont les staphylocoques, mais aussi les Gram négatifs.

Ce type de résistance peut aussi concerner les aminosides qui peuvent être inactivées par des enzymes bactériens tels que ; les N-acétyltransférases, les O-nucléotidases et les O-phosphorylases.

L'érythromycine estérase, chez *Escherichia coli*, inactive le cycle lactone de l'érythromycine. Ce mode de résistance plasmidique est toutefois assez rare.

### **b) Résistance par altération de la cible bactérienne**

Pour être actifs les antibiotiques doivent se fixer sur leurs cibles. Suite à une modification de ces cibles, certaines bactéries peuvent rester insensibles à l'action d'un antibiotique. Les antibiotiques inhibiteurs d'enzyme sont rendus inactifs lorsqu'une mutation de l'enzyme-cible y empêche leur liaison. Ainsi La résistance aux fluoroquinolones peut être due à la mutation de l'ADN gyrase, qui empêche la formation du complexe ternaire fluoroquinolone - gyrase - ADN. Ce mode de résistance est décrit pour *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries, *Escherichia coli* et les bactéries Gram positif. La résistance aux bêta-lactamines peut être due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PLP suite à une mutation de celles-ci.

### **c) Résistance par altération de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie (41)**

La membrane externe des Gram négatifs peut constituer une barrière à la pénétration des antibiotiques. A travers cette membrane de petits canaux aqueux appelés porines permettent le passage de petites molécules hydrophiles. Ainsi, des molécules antibiotiques trop volumineuses ou insuffisamment hydrophiles ne pourront emprunter cette voie d'accès et ne pénétreront que modestement dans les bactéries. Toute mutation affectant une porine va perturber la pénétration de l'antibiotique dont elle permet le passage.

L'antibiotique au sein de la bactérie peut être aussi expulsé vers l'extérieur par un système de pompes actives localisées sur la membrane interne.

Ce phénomène connu sous le nom d'efflux actif a été décrit pour les fluoroquinolones, les tetracyclines et les macrolides.

Ces mécanismes sont responsables :

- des résistances naturelles : c'est à dire quand les souches sont toujours résistantes aux antibiotiques (elles ne sont pas gênantes car prévisibles ).
- des résistances acquises : seules quelques souches sont résistantes dans une espèce bactérienne (elles sont gênantes car imprévisibles ).

La résistance aux antibiotiques est favorisée par l'usage des antibiotiques qui exercent une pression de sélection en privilégiant la croissance de souches résistantes ou en induisant l'expression de phénotypes inductibles.

## ***B. RAPPELS SUR LES METHODES D'ETUDE DES ANTIBIOTIQUES (8, 9, 12)***

Le rôle majeur d'un antibiotique est d'abaisser et de détruire le plus rapidement possible le nombre de bactéries au niveau du site d'infection. La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est une étape indispensable au choix des molécules thérapeutiques à utiliser. Cette détermination est basée sur l'étude de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique réalisé dans un milieu de culture. L'efficacité d'un antibiotique sur une souche peut s'exprimer en terme de bactériostase et de bactéricidie.

### **1. Bactériostase**

#### **a) Définition**

La bactériostase correspond au ralentissement de la croissance d'une population bactérienne sans phase de destruction. Celle ci est considérée pour des bactéries qui ont été mises en contact avec l'agent antibiotique lors de leur phase de

croissance. Lorsque l'activité bactériostatique est maximale la population bactérienne reste égale à celle de l'inoculum de départ.

## **b) Caractérisation**

### **◆ *La CMI (8,13)***

Dans le cas usuel d'un micro organisme à croissance rapide (24 h), la CMI correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber dans un milieu de culture toute croissance visible de la souche après 18-24 heures d'incubation à 37°C. La CMI est souvent exprimée en µg/ml.

### **◆ *La concentration inhibitrice 50% (CI 50%)***

C'est un analogue de la concentration létale 50% utilisée en toxicologie. La CI 50 est la concentration d'antibiotique permettant de réduire de 50 % la croissance bactérienne par rapport à la culture témoin sans antibiotique.

La CMI et la CI 50% ne sont pas des constantes ce sont des grandeurs phénoménologiques qui varient selon les conditions opératoires de leur détermination.

## **c) Méthodes de détermination de la CMI**

Deux types de méthodes permettent de déterminer la CMI :

### **◆ *Méthodes de détermination en milieu liquide (8)***

Ici le milieu de culture utilisé est liquide, il s'agit le plus souvent du milieu M H. Dans des tubes stériles on prépare une gamme de concentration d'antibiotique en solution dans le milieu. La gamme suit le plus souvent une décroissance géométrique de raison  $\frac{1}{2}$ . A chaque dilution est ajouté le même volume d'un inoculum bactérien standardisé. Un tube ne recevant pas d'antibiotique est considéré comme tube témoin. Après une incubation de 18-24h à 37 °C, la lecture se fait à l'œil. La CMI correspond au premier tube ne montrant pas de trouble apparent. Cette méthode de dilution en milieu liquide

est adaptée en macrométhodes avec l'utilisation de tubes en verre ou en microméthodes dans les plaques de microtitration à 96 cupules.

◆ **Méthodes de détermination en milieu gélosé**

• **Méthodes de dilution**

C'est la méthode de référence. Ici une gamme de concentrations en antibiotique est réalisée en incorporant les solutions d'antibiotiques dans la gélose nutritive. Celle-ci est ensuite coulée dans les boîtes de pétri. Les boîtes sont ensuiteensemencées avec un inoculum bactérien d'environ  $10^4$  bactéries viables. La lecture se fait après 18-24 h d'incubation. La CMI correspond à la première boîte montrant moins de deux colonies sur l'emplacement de dépôt de l'inoculum.

• **Méthodes de diffusion**

La plus utilisée actuellement est celle du **e-test®**. Cette technique est fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester. Les bandelettes sont des supports inertes et hydrophobes de 80 mm de long sur 5mm de large. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablementensemencée avec la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduira par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelette définit la CMI. L'échelle de concentration imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une lecture rapide.

**d) Intérêts, problèmes et limites de la détermination de la CMI**

◆ **Intérêts (8, 13)**

Pour une souche donnée, la CMI d'un antibiotique est utilisée comme terme d'appréciation de son efficacité. Usuellement la souche sera dite sensible si la CMI est inférieure à la concentration d'antibiotique obtenue dans l'organisme. La souche sera considérée comme résistante si la CMI est

supérieure aux concentrations maximales retrouvées dans l'organisme. Ainsi la CMI pourrait être considérée comme un critère prédictif du résultat clinique.

La CMI est aussi un paramètre d'évaluation permettant la comparaison entre la souche étudiée et d'autres bactéries connues pour leur comportement vis à vis de l'antibiotique testé.

#### ◆ Problèmes et limites

D'une part, la CMI est une variable qui dépend de plusieurs facteurs. L'hétérogénéité de la souche bactérienne et la sensibilité différentielle des individus la composant fait que la CMI caractérise la sensibilité de la bactérie la moins sensible. Ainsi il a été montré que la CMI augmenterait avec la taille de l'inoculum bactérien. D'autre part, du fait que la CMI est déterminée à partir de dilutions successives d'antibiotiques, sa sensibilité dépendra du choix de la concentration de départ. La CMI théorique étant en réalité comprise entre deux points de gamme. Certaines molécules antibiotiques donnent dans l'organisme des métabolites plus actifs. C'est le cas de la clarithromycine qui donne chez l'homme un métabolite 14-hydroxylé. Ce métabolite donne pour certaines espèces bactériennes des CMI égales ou inférieures d'une dilution à celle de la clarithromycine (51).

## 2. Bactéricidie

### a) Définition (12, 13)

La bactéricidie désigne la destruction et la mort de bactéries sous l'effet d'un antibiotique par incapacité de se multiplier.

Un antibiotique a un effet bactéricide à un temps donné lorsque le nombre de bactéries viables (capables de se reproduire en présence d'une concentration définie d'antibiotique) est inférieur à celui de l'inoculum de départ.

Cette bactéricidie s'effectue selon deux modalités essentielles :

-Une mortalité dépendante de la concentration : ici l'effet est proportionnel à la concentration d'antibiotique, cependant l'accroissement de la létalité est freiné

au-delà d'une certaine concentration. Les aminosides, l'imipénème et les fluoroquinolones (pour les bacilles Gram négatif) sont des antibiotiques « concentration dépendants ».

-Une mortalité « temps dépendante » : ici l'effet est de type tout-ou-rien ; la vitesse de mortalité est maximale dès que le seuil de bactéricidie est atteint. Les betalactamines et les glycopeptides sont concernées par ce type d'activité bactéricide.

### **b) Caractérisation (8)**

L'activité bactéricide est appréciée par la concentration minimale bactéricide (CMB) et par les cinétiques de bactéricidie.

#### **◆ *La CMB***

C'est la plus petite concentration qui laisse un faible pourcentage de bactéries survivantes après une incubation de 18-24 h.

Ce pourcentage est usuellement fixé à 0,01% en France et à 0,1% dans les pays anglo-saxons.(8)

La CMB se présente comme un analogue de la CMI, elle est d'ailleurs exprimée en ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### **◆ *Les cinétiques de bactéricidie***

Elles permettent d'évaluer la décroissance de l'inoculum bactérien en fonction du temps et des concentrations d'antibiotique.

### **c) La CMB (8, 12, 13)**

#### **◆ *Les méthodes d'étude***

La CMB est déterminée selon le même principe que la détermination de la CMI en milieu liquide. Après la lecture de la CMI, une numération des bactéries survivantes est effectuée à partir des concentrations d'antibiotiques supérieures à la CMI par repiquage sur gélose sans antibiotique. On détermine ainsi la plus

petite concentration d'antibiotique laissant moins de 0,01% de bactéries survivantes par rapport à l'inoculum de départ.

Les méthodes d'études sont celles des méthodes de dilution en milieu liquide. Elles sont réalisées soit en tubes (macrodilution) soit en microplaques (microdilution). Le milieu le plus utilisé reste celui de Mueller-Hinton, les concentrations d'antibiotiques suivent une progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$ .

#### ◆ *Problèmes et limites de la CMB*

Deux paramètres essentiels interviennent dans les méthodes d'étude de la CMB : le temps d'incubation et le nombre de survivants fixé de manière arbitraire.

La CMB étant déterminée en point final (au bout de 24h), elle ne reflète pas la dynamique complexe de l'activité bactéricide d'un antibiotique. En effet elle globalise la phase précoce de bactéricidie et la phase de recroissance bactérienne qui peut la suivre. Les problèmes liés à la stabilité de l'antibiotique en solution aqueuse ne seront pas mis en évidence par ce paramètre. La définition arbitraire du seuil de survivant entraîne une classification artificielle des souches sensibles et des souches résistantes ou tolérantes à l'effet bactéricide. Ainsi des souches voisines mais de part et d'autre de cette valeur de coupure seront séparées, alors des souches de comportements cinétiques différents seront réunies.

La présence d'un effet paradoxal rend également difficile l'interprétation de la CMB. En effet avec certaines souches le pourcentage de survivants est inférieur à 0,01% pour les concentrations proches de la CMI, mais il est supérieur pour des concentrations plus élevées. Ce qui pose le problème du choix de la concentration représentant la CMB. L'effet paradoxal est surtout retrouvé avec les bêta-lactamines dans ce cas l'une des hypothèses explicatives serait que les fortes concentrations d'antibiotiques inhiberaient la synthèse des protéines dans la bactérie empêchant de ce fait la multiplication bactérienne nécessaire à l'activité de l'antibiotique.

L'utilisation de la CMB comme outil de définition de la notion de tolérance est très discutée. En effet le phénomène de tolérance traduit une vitesse de bactéricidie plus lente. De manière classique la tolérance d'une souche est étudiée en calculant le rapport CMI/CMB qui doit être supérieur ou égal à 32 pour les souches tolérantes.

#### **d) Les cinétiques de bactéricidie**

L'objectif de ces méthodes est une étude de l'activité bactéricide des antibiotiques en tenant compte de deux paramètres essentiels que sont la concentration de l'antibiotique et le temps d'incubation.

Des modèles statiques et dynamiques sont utilisés pour étudier les cinétiques de bactéricidie. (18)

##### **◆ Méthodes d'études**

###### **• Modèles statiques**

Ici dans le milieu nutritif, l'inoculum bactérien est mis en contact avec des concentrations d'antibiotiques maintenues constantes durant l'expérience. Le mélange est incubé à 37°C. A des temps donnés, des aliquotes de ce mélange sont prélevés pour dénombrer les bactéries viables. Les résultats de ces dénombrements permettront de tracer les courbes de bactéricidie pour chaque concentration.

###### **• Modèles dynamiques**

Ils sont inspirés des modèles statiques, mais ils sont plus réalistes car les concentrations d'antibiotiques utilisées vont varier en fonction du temps se rapprochant ainsi des conditions réelles in-vivo. En effet dans l'organisme les concentrations d'antibiotiques ne sont pas fixes, après administration elles évoluent selon la pharmacocinétique de la molécule étudiée. (22)

Un des premiers modèles fut celui de la vessie urinaire de O'Grady en 1966 (38), il simule les conditions de cystites non suivies de complications. Ici

la culture bactérienne diluée dans un bouillon est contenue dans une vessie de verre. Celle-ci est vidée à intervalles réguliers en laissant un volume résiduel. Une lecture turbidimétrique de la croissance bactérienne en présence de l'antibiotique est régulièrement réalisée à la base de la vessie. Ce modèle permettant de reproduire le profil d'excrétion rénale d'un antibiotique a été amélioré et automatisé. Le modèle de *San Filippo et Morvillo* (44) permet de reproduire les taux sériques de l'antibiotique.

Ces modèles dynamiques permettent de reproduire toutes les variations pharmacocinétiques des concentrations d'antibiotiques rencontrées en thérapeutique.

◆ *Intérêts des cinétiques dans l'évaluation de l'activité bactéricide d'un antibiotique.*

Les cinétiques de bactéricidie sont des méthodes longues et assez fastidieuses. Elles étudient l'activité d'un antibiotique en fonction de la concentration et du temps. L'intérêt pour ces méthodes est cependant justifié par plusieurs raisons :

- Les limites de la CMB dans l'évaluation des phénomènes de bactéricidie.
- L'augmentation des infections profondes, et de celles intervenant sur terrain immunodéprimé.
- Possibilité de prédire l'efficacité thérapeutique d'un traitement antibiotique.
- Ces méthodes permettent aussi de mesurer la vitesse de bactéricidie qui traduit une certaine efficacité antibiotique.
- Les cinétiques de bactéricidie permettent également la mise en évidence du mode d'action des antibiotiques et de distinguer deux grands types d'antibiotiques ; ceux dont la vitesse dépend de la concentration et les antibiotiques « temps dépendant » dont l'activité maximale est atteinte au bout d'un certain temps. (8)

- Outre l'intérêt des cinétiques pour visualiser les phases précoces et tardives de la bactéricidie elles seraient les meilleures méthodes pour détecter les bactéries tolérantes. (25)

Les cinétiques permettent aussi de détecter les phases tardives de recroissance qui se traduisent au plan clinique par des rechutes.

### **3. Facteurs techniques modifiant la CMI, la CMB et les cinétiques de bactéricidie**

L'activité bactériostatique et bactéricide des antibiotiques est soumise à l'influence de plusieurs facteurs techniques. Ceci limite la reproductibilité des méthodes de détermination de la CMI, de la CMB et des cinétiques de bactéricidie.

Ainsi interviendront différents paramètres du milieu de culture : les conditions de culture, la nature du récipient, l'agitation, l'atmosphère et le temps d'incubation. D'autres facteurs importants interviendront aussi, à savoir l'inoculum bactérien et le transport d'antibiotiques.

#### **a) Influence du milieu de culture**

Le milieu de culture est un facteur important. Il affecte l'activité de certains antibiotiques de par sa teneur en cations, son pH et la présence de substances antagonistes diverses. De par sa qualité nutritive, le milieu va aussi influencer les paramètres de croissance de la bactérie (phase de latence, vitesse, temps de génération)

##### **◆ Composition du milieu (9, 12)**

La composition du milieu en nutriments joue un rôle très important. En effet un milieu riche en peptone favorise l'effet des antibiotiques agissant sur les bactéries en voie de multiplication (cas des bêta-lactamines), alors qu'un milieu pauvre va favoriser les antibiotiques agissant sur les bactéries au repos. Les protéines du milieu peuvent aussi agir en se liant à une partie des antibiotiques.

En général le milieu utilisé pour l'étude des antibiotiques est celui de Mueller-Hinton. Le milieu trypticase-soja n'est pas employé car ayant une activité inhibitrice sur les aminosides et les tetracyclines.

#### ◆ *Influence du pH*

A pH acide certains antibiotiques tels que les bêta-lactamines ont une meilleure activité bactériostatique alors que le pH alcalin favoriserait l'action des aminosides et des macrolides. (52)

D'après *Horne et Tomaz*, un pH acide favorise la tolérance bactérienne. L'inhibition d'une autolysine expliquerait ce phénomène. *Handwerger et al.* ont montré qu'une variation de pH au site d'infection pouvait expliquer une variation du taux de bactéricidie. (25)

#### ◆ *Atmosphère d'incubation*

Elle agit par modification du pH. Ainsi une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> peut modifier le pH et diminuer l'activité d'antibiotiques tels que les aminosides (8).

### **b) Influence du récipient**

Le volume du récipient va influencer le volume du milieu et de la population bactérienne globale. Les petits volumes de 100 à 200µl utilisés dans les micro-méthodes permettront l'étude de populations de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>. Ce niveau est généralement inférieur à la fréquence de mutation des bactéries rendant ainsi difficile l'émergence d'une hétérogénéité dans la population (50).

La nature et la forme des récipients sont aussi importantes. En effet plus la surface de contact avec le milieu de culture est grande, plus l'activité bactéricide est faible et plus le taux de recroissances tardives sera élevé. Ce phénomène est provoqué par des bactéries adhérentes à la paroi du récipient, juste au dessus du ménisque du milieu de culture. Ces bactéries ne sont pas en contact avec l'antibiotique et échappent de ce fait à l'action lytique (8). Le taux d'adhérence

aux parois diffère selon la nature du récipient. Certains auteurs ont trouvé, dans des conditions comparables, un taux d'adhérence et donc un taux de survivants plus élevé pour les tubes en plastiques par rapport aux tubes en verre (47).

Une agitation 4h avant le répiquage de la 24<sup>ème</sup> h est vivement conseillée pour permettre une remise en contact de l'antibiotique avec les bactéries demeurées sur les parois. Cette agitation permet aussi la dispersion des agrégats bactériens qui se forment pour certaines espèces bactériennes notamment *P. aeruginosa*. Les bactéries au centre de ces agrégats peuvent en partie être protégées du contact avec l'antibiotique (47, 50).

### c) Autres facteurs influencants

#### ◆ *L'inoculum bactérien*

Sa taille et son état physiologique sont très importants. L'activité bactéricide des antibiotiques diminue lorsque la taille de l'inoculum augmente. Ainsi l'ICS recommande pour la détermination des CMI et CMB d'utiliser des inocula calibrés à  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml. Le NCCLS recommande un inoculum de  $5.10^5$  UFC/ml pour les bactéries aérobies et un inoculum de  $5.10^6$  UFC/ml.(36)

Concernant l'état physiologique, la phase de croissance est importante. L'action des antibiotiques ne s'exerce en général que sur des bactéries en phase de croissance. Ainsi l'utilisation d'une culture stationnaire diminue l'activité bactéricide de la plupart des antibiotiques (8, 25). Cependant pour certaines molécules telles que les pénèmes et les aminosides, l'activité bactéricide peut s'exercer en l'absence de multiplication (8).

*Handwerger et al.* ont montré que le phénomène de tolérance de *Staphylococcus aureus* vis à vis des bêta-lactamines était le plus souvent observé sur des bactéries en phase stationnaire. Pour d'autres auteurs tels que *Goessens et al* (21), la tolérance est indépendante de la phase de croissance.

#### ◆ *Temps de réincubation*

Il est souvent limité à 24 h. Selon certains auteurs un délai de 48 à 72 heures est nécessaire pour obtenir la croissance de toutes les bactéries viables sur le milieu de dénombrement (47).

Cependant l'allongement de ce temps peut entraîner la mort des bactéries dont la multiplication est stoppée.(8)

#### ◆ *Transport d'antibiotiques*

Lors du repiquage permettant le développement des bactéries survivantes et donc leur dénombrement, une quantité d'antibiotique peut-être transférée du milieu de culture sur les géloses. Cette quantité peut-être suffisante pour empêcher la croissance des bactéries viables et surévaluer de ce fait les activités bactéricides. Ce phénomène de « carry-over » ou transport d'antibiotique est observé pour toutes les méthodes utilisées. Ce facteur est important pour les méthodes où un volume important (10µl ou plus) de mélange (antibiotique bactéries) est directement repiqué sur la gélose de dénombrement. (47)

#### ◆ *Choix du temps de repiquage*

Concernant l'étude des cinétiques 4 repiquages sont indispensables pour comparer et détecter les antibiotiques à bactéricidie rapide et ceux dont une phase de latence précède l'activité. Un repiquage tardif permettra de mettre en évidence les phénomènes de recroissances tardives. Il est recommandé d'effectuer 5 repiquages en moyenne aux temps 0 h ; 1,5-2 h ; 3-4 h ; 6-8 h et un dernier à 18-24 h. (8)

La standardisation des méthodes de détermination du pouvoir bactéricide des antibiotiques est indispensable pour obtenir une bonne reproductibilité et une bonne fiabilité des résultats. Une bonne reproductibilité est indispensable pour comparer les résultats de différents laboratoires.

Matériel et  
méthodes

### **III. MATERIEL ET METHODES**

Ce travail a été effectué au niveau de l'unité de recherche de microbiologie du laboratoire de bactériologie virologie de l'HALD.

#### **A. SOUCHES BACTERIENNES ET ANTIBIOTIQUES**

Les souches de notre étude sont testées en même temps que des souches de références dont les valeurs critiques sont connues ce qui permet de valider les résultats obtenus.

##### **1. Souches à tester**

Notre étude porte sur 44 souches dont l'isolement et l'identification ont été faites au laboratoire par les méthodes classiques. Ces souches ont été isolées de bactériémie, d'infections respiratoires basses, d'otites, d'infections cutanéomuqueuses et ostéoarticulaires.

Les prélèvements ont été effectués sur des patients de l'HALD. Il s'agit de souches isolées de bactériémies (staphylocoque et bacilles gram négatifs) au service de réanimation, d'otites (*Pseudomonas aeruginosa*) en ORL, d'infections cutanées (Staphylocoques, *Pseudomonas*) et d'infections respiratoires basses (pneumocoques)

Ces souches ont été isolées entre Mars 1999 et Avril 2000. Elles ont été conservées dans des bouillons adéquats à l'intérieur de cryotubes NUNC<sup>®</sup> gardés à - 20°C.

##### **2. Souches de référence**

Nous avons utilisé les souches type ATCC, souches pour lesquelles les valeurs critiques de la CMI pour certains antibiotiques sont connues.

Les souches de références utilisées sont les suivantes :

Valeurs critiques de la CMI en mg/l

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Ciprofloxacin : 0,004-0,015
	Gentamicin : 0,25-1
	Ampicillin : 0,25-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ciprofloxacin : 0,25-1
	Gentamicin : 1-4

### 3. Antibiotiques de l'étude

Les antibiotiques utilisés appartiennent aux familles suivantes

Bêta-Lactamines:

- Amoxicilline
- Cefazoline
- Ceftriaxone
- Cefatrizine

Quinolones:

- Ciprofloxacin

Macrolides

- Spiramycine
- Erythromycine
- Clarithromycine

Aminosides:

- Gentamicine

## **B. MATERIEL ET REACTIFS**

### **1. Materiel**

- Microplaques de 96 cupules avec couvercle en polystyrène.
- Pipettes, micropipettes (Gilson<sup>®</sup>).
- Embouts stériles.
- flacons en verre stériles.
- Bacs pour pipettes multicanaux.
- Autoclaves.
- Balance de précision.
- Agitateur VORTEX<sup>®</sup>.
- Etalon Mac Farland 0,5.
- Cryotubes NUNC<sup>®</sup>.
- Tubes à essai stériles.
- Seringues de 10cc stériles.
- Filtres à seringue stériles.
- Boite de pétri stériles.
- Etuves.
- Lampe UV.
- Four à micro-ondes.

### **2. Réactifs**

- Eau distillée et soluté de NaCl à 9‰ stérils.
- Gélose et bouillon Muller-Hinton.
- Bouillon Cœur-cervelle.
- Gélose au sang cuit.
- Solutions d'antibiotiques à une concentration de 1024 mg/l.
- Tampons phosphate stériles.

## C. METHODES

### 1. Préparation des solutions mères d'antibiotiques

#### a) Réactifs

- Antibiotiques du commerce sous forme de poudre d'une très grande pureté.
- Eau distillée stérile.
- solvant et diluant appropriés selon l'antibiotique (voir tableau suivant)
- **TABLEAU I**: Solvants et diluants de préparation des solutions d'antibiotiques

Antibiotiques	Solvants	Diluants
Amoxicilline	Tampon phosphate 0,1M pH 6	eau distillée stérile
Clarithromycine	Methanol	eau distillée stérile
Erythromycine	Methanol	Tampon P 0,1M pH8
Spiramycine	Acétone	eau distillée stérile
Gentamicine	Tampon P 0,1M pH8	eau distillée stérile
Ceftriaxone	Tampon phosphate 0,1M pH 6	eau distillée stérile
Ciprofloxacine	eau distillée stérile	eau distillée stérile
Céfazoline	Tampon phosphate 0,1M pH 6	eau distillée stérile

#### b) Protocole

Les antibiotiques sont préparés sous forme de solutions mères concentrées à 10240mg/l. Ces solutions sont ensuite aliquotées et conservées dans des cryotubes à -20°C jusqu'à leur utilisation.

La poudre d'antibiotique est dissoute dans un volume approprié de son solvant, après dissolution totale, on complète avec le diluant en volume suffisant

pour atteindre la concentration requise. Il faut bien agiter au vortex pour obtenir une parfaite dissolution, la solution ainsi obtenue est passée à la filtration stérilisante à l'aide d'une seringue et d'un filtre à seringue.

Toutes ces opérations doivent être faites dans des conditions rigoureuses d'asepsie. Certains antibiotiques de grande taille moléculaire comme les aminosides peuvent, lors de la filtration, être retenus adsorbés dans la membrane du filtre, dans ces cas on évite la filtration, les conditions d'asepsies pour leur préparation sont encore plus strictes.

Notons que certains antibiotiques sous forme de poudre ne sont pas à l'état pur. Le degré d'impureté sera pris en compte en prenant en considération à côté de la masse, l'activité spécifique de la poudre donnée par le fabricant. Celle ci permettra selon le cas de déterminer la masse d'antibiotique à utiliser ou le volume de dissolution (diluant et solvant) à utiliser pour obtenir la solution souhaitée.

$$\text{Masse(mg)} = \frac{\text{Volume(ml)} \times \text{concentration désirée en } \mu\text{g/ml}}{\text{Activité spécifique } (\mu\text{g/g})}$$

$$\text{Volume de diluant} = \frac{\text{Masse (mg)} \times \text{Activité spécifique}(\mu\text{g/g})}{\text{concentration désirée en (mg/l)}}$$

## 2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum doit être rigoureusement calibré à  $10^6$ UFC/ml (étalon Mc Farland 0,5). Il doit être préparé à partir de bactéries "jeunes" de 24 heures donc les souches sont repiquées sur milieu gélosé la veille de la manipulation.

A l'aide de l'anse platiné on touche 4 à 5 colonies bien isolées de la bactérie à étudier. Pour ce qui est de pneumocoques, il est nécessaire pour récupérer assez de bactéries de racler la surface de la gélose avec un écouvillon

stérile. Les bactéries ainsi prélevées sontensemencées dans des tubes en verre contenant 2 à 4 ml de bouillon adéquat puis incubées pendant 2 à 3 heures à 37°C. Le but de cette opération étant d'obtenir pour le test des bactéries en phase exponentielle de croissance. Avec de le soluté isotonique de NaCl, on ajuste la turbidité de ces suspensions bactériennes ainsi obtenues par rapport à celle de l'étalon 0,5 sur l'échelle Mac Farland. Par la suite un volume de 100µl de cet inoculum contenant environ  $10^6$ UFC/ml sera dilué au demi en l' ajoutant dans les cupules contenant déjà 100µl de bouillon avec antibiotique. On obtiendra alors des charges bactériennes de  $5.10^5$ UFC au départ dans les cupules de la microplaque.

L'inoculum est distribué dans les cupules 15 à 20 mn après son obtention.

### **3. Ensemencement des microplaques et lecture**

Nous avons utilisé la méthode de micro dilution en milieu liquide .

Dans les cupules d'une microplaque stérile on distribue 100µl de bouillon de culture adéquat, sur une série de 16 cupules on effectue une dilution sériée de 2 à 2 de 100µL de la solution d'antibiotique à 1024 mg/l (dilution au dixième de la solution mère) la première cupule ne reçoit pas l'antibiotique elle sert de témoin ainsi sur la série de 15 cupules suivantes on aura la gamme décroissante de concentrations en antibiotique allant de 512 µg/ml à 0,03 µg/ml.

Ces cupules ainsi préparées reçoivent chacune 100µl de l'inoculum bactérien qui est une suspension bactérienne calibrée à  $10^6$  UFC/ml (Mac Farland 0,5).

les concentrations d'antibiotique dans ces cupules vont chuter de moitié.

L'incubation est effectuée dans une étuve à 37°C.

Afin de déterminer les cinétiques de bactéricide et les CMB, des repiquages sur un milieu gelosé sans antibiotique en raison de 10µl pour chaque cupule test seront effectués à 1h, 2h, 4h, 6h, 12h et 24h après mise en contact.

Le repiquage n'est pas nécessaire pour les cupules où apparaissent un trouble, donc une croissance bactérienne évidente.

Cette méthode permet de déterminer au bout de 18-24 heures la concentration minimale inhibitrice qui est la plus faible concentration d'antibiotique permettant d'obtenir une inhibition de toute croissance visible dans les cupules au bout de 24 heures. Elle permet aussi de déterminer la cinétique de bactéricidie et la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est la plus faible concentration d'antibiotique permettant de détruire 99,9% de la population bactérienne au bout de 18 heures de contact. La lecture de la cinétique de bactéricidie se fera sur les géloses de dénombrement 24 heures après leur repiquage. Le seuil de coupure pour établir une bactéricidie à 99,9% est de 5 colonies.

#### **D. CONTROLE DE QUALITE**

Un contrôle de qualité est effectuée à tous les niveaux.

L'utilisation de souches de références permet de juger de la reproductibilité des tests. Leur utilisation est accompagnée de l'observance d'un certain nombre de règles :

Usage stricte de souches de références sûres types ATCC.

Bonne conservation des souches selon deux modalités ; conservation dans des cryotubes à  $-70^{\circ}\text{C}$  pour l'utilisation à longue durée ou une conservation en stock de culture pour l'utilisation en routine.

Concernant les milieux et réactifs, il faut vérifier qu'ils ne sont pas arrivés à péremption et que leur stockage s'effectue dans les conditions recommandées par le fabricant.

La qualité est aussi obtenue par un respect strict des protocoles établis lors des manipulations.

Résultats  
et  
Commentaires

## IV. RESULTATS ET COMMENTAIRES

### A. *Streptococcus pneumoniae*

Les macrolides ont montré une CMI très basse sur la totalité des souches (CMI<2mg/l). L'amoxicilline a montré une action bactéricide sur cinq souches et une action tolérante pour les deux autres. Les macrolides présentent des caractéristiques bactéricides et bactériostatiques selon les souches.

**Tableau II :** Effectifs cumulés d'inhibition des souches de *Streptococcus pneumoniae* par différentes concentrations d'antibiotiques.

CMI(mg/l)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Amoxicilline	0	0	1	1	1	3	5	6	6	6	7				
Clarithromycine	3	5	6	6	6	6	6	7							
Erythromycine	0	2	4	6	6	6	7								
Spiramycine	0	0	1	1	4	7									

**Tableau III :** Rapport CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches de *Streptococcus pneumoniae*

CMI/CMB	1	2	4	8	16	32
Amoxicilline	4	1			1	1
Clarithromycine	3	2	1	1		
Erythromycine	4	2				
Spiramycine	3	1	1	1	1	

**Tableau IV :** CMB 99,9% et cinétique de bactéricidie des différents antibiotiques testés sur les souches de *Streptococcus pneumoniae* (effectifs cumulés de bactéricidie)

CMB (mg/l)	temps en heures	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Amoxicilline	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3	4	4	4	4	6
	2	0	0	1	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4	6
	4	0	0	1	1	1	1	2	3	4	4	4	4	5	6
	6	0	1	1	1	1	2	2	4	4	4	4	4	5	6
	12														
	24	0	1	1	1	3	4	4	4	4	4	5	5	5	6
Clarithromycine	1	0	0	0	0	0	1	3	5	5	5	6			
	2	0	0	0	0	0	2	5	5	5	6				
	4	0	0	0	1	3	4	5	6						
	6	1	2	34	4	5	5	6							
	12														
	24	3	3	5	5	5	5	6							
Erythromycine	1	0	0	0	0	1	2	2	2	3	5	5	6		
	2	0	0	1	1	2	2	3	4	5	5	56			
	4	0	1	1	1	2	3	4	6						
	6	1	2	2	3	5	5	5	6						
	12														
	24	2	3	4	5	5	6								
Spiramycine	1	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6				
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6				
	4	0	0	0	0	0	1	1	4	5	6				
	6	0	0	1	1	1	2	2	5	5	6				
	12														
	24	0	1	1	2	4	4	5	6						

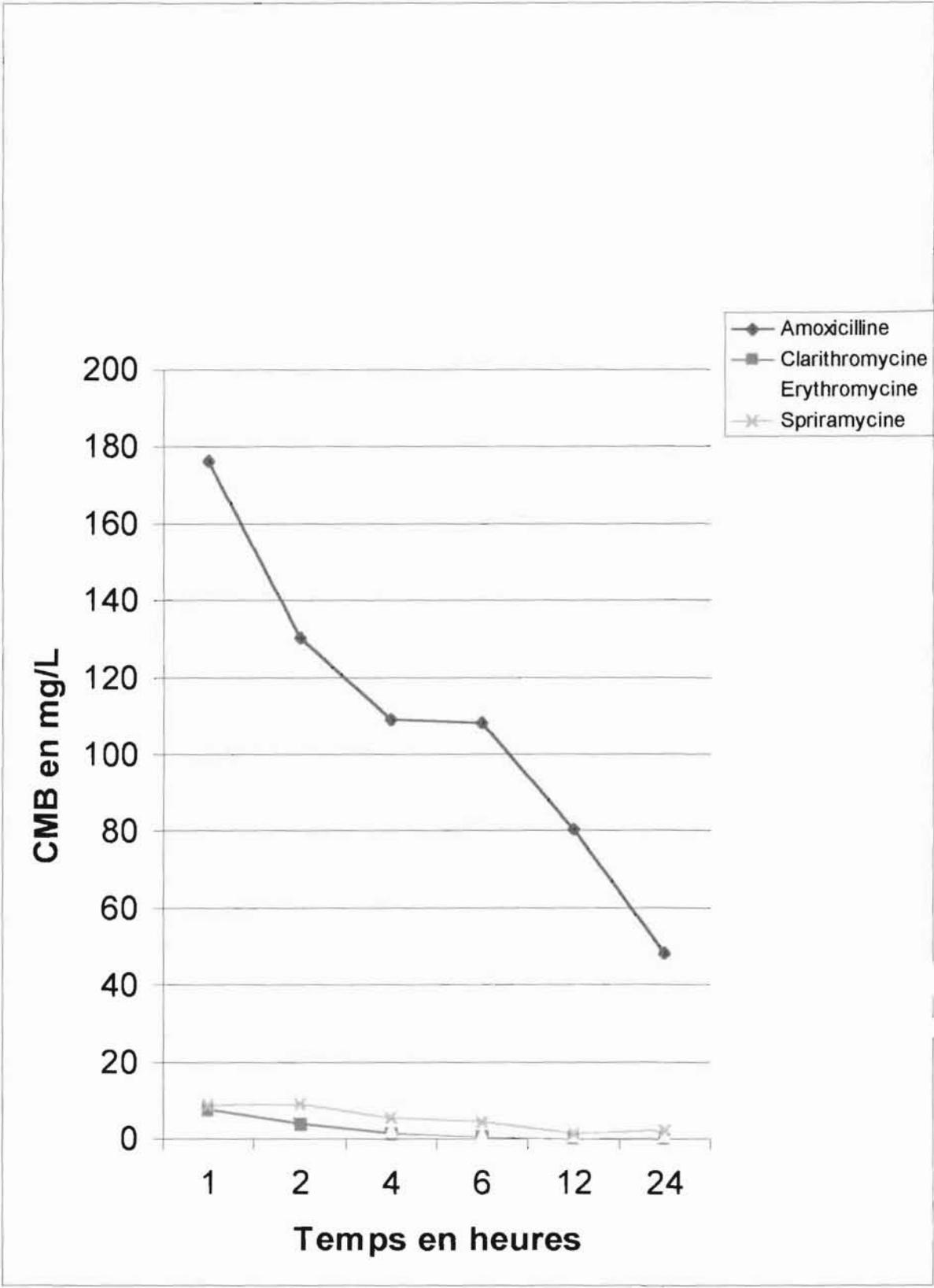


Figure 1 : Courbes de bactéricidie pour *Streptococcus pneumoniae*

## B. *Staphylococcus aureus*

Les céphalosporines présentent des CMI assez élevées, Les CMI de la ciprofloxacine sont assez basses alors que celles de la gentamicine sont intermédiaires. L'activité de la ciprofloxacine est de type exclusivement bactéricide sur les 14 souches testées. Les bêta-lactamines sont plutôt tolérantes. Trois souches se sont montrés résistantes à la céfazoline et deux autres à la ceftriaxone.

**Tableau V :** Effectifs cumulés d'inhibition des souches de *Staphylococcus aureus* par différentes concentration d'antibiotiques.

CMI(mg/ml)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cefazoline	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	3	5	10	11	14
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	9	11	12	12	14
ciprofloxacine	0	0	0	2	2	6	7	9	12	14					
Gentamicine	0	0	0	0	3	6	6	10	13	13	13	14			

**Tableau VI :** Rapport CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

CMI/CMB	1	2	4	8	16	32
Céfazoline		7	1	2		
Ceftriaxone		2	1	4	3	2
ciprofloxacine	12	2				
Gentamicine	8	4	1		1	

**Tableau VII :** CMB 99,9% et cinétique de bactéricidie des différents antibiotiques testés sur les souches de *Staphylococcus aureus* (effectifs cumulés de bactéricidie)

CMB (mg/l)	temps en heures	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Céfazoline	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	14
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	6	14
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	5	9	14
	6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	7	10	14
	12	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	3	9	10	14
	24	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	4	8	10	14
Ceftriaxone	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	14
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	14
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	14
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	14
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	5	8	14
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5	6	10	14
ciprofloxacine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	9	10	13	14		
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	7	10	11	14			
	4	0	0	0	0	0	4	6	7	11	11	13	14			
	6	0	0	1	1	4	7	7	10	12	13	14				
	12	0	0	1	1	4	7	7	10	13	14					
	24	0	0	2	2	6	7	9	10	14						
Gentamicine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	9	9	13	13	14
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	3	8	9	12	13	13	14
	4	0	0	0	0	0	1	2	5	9	9	13	13	13	13	14
	6	0	0	0	0	0	0	2	5	9	12	13	13	14		
	12	0	0	0	0	0	1	5	13	13	13	13	14			
	24	0	0	0	0	4	4	7	13	13	13	13	14			

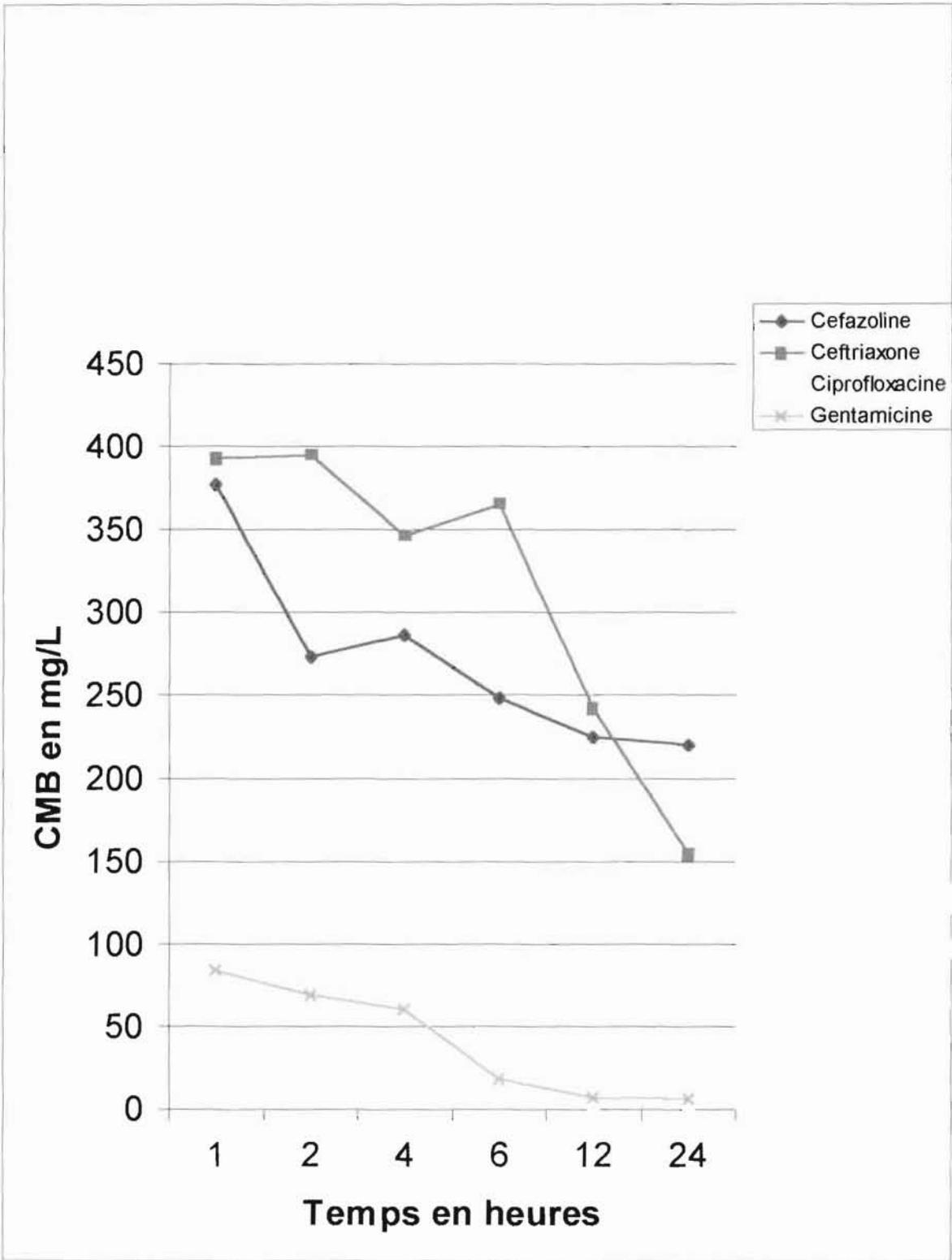


Figure 2 : Courbes de bactéricidie pour *Staphylococcus aureus*

### C. *Staphylococcus spp (non aureus)*

Les activités antibiotiques sont plutôt de type bactéricide avec des CMI basses pour la ciprofloxacine et la gentamicine. Cette bactéricidie est rapidement obtenue pour la ciprofloxacine au bout de 6 heures et avant 12 heures pour la gentamicine. Un temps de contact plus long est nécessaire avec les céphalosporines pour obtenir un abattement bactérien considérable.

**Tableau VIII :** Effectifs cumulés d'inhibition des souches de *Staphylococcus spp* par différentes concentrations d'antibiotiques.

CMI(mg/l)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cefazoline	0	0	0	1	1	1	3	4	4	5	5	5	6		
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	5	5	6		
ciprofloxacine	0	0	1	5	5	6									
Gentamicine	0	0	1	4	4	6									

**Tableau IX :** Rapport CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches de *Staphylococcus spp*.

CMI/CMB	1	2	4	8	16	32
Cefazoline	3	2	1			
Ceftriaxone	2	2	2			
ciprofloxacine	4	2				
Gentamicine	3	2	1			

**Tableau 10 :** CMB 99,9% et cinétique de bactéricidie des différents antibiotiques testés sur les souches de *Staphylococcus spp* (effectifs cumulés de bactéricidie)

CMB (mg/l)	temps en heures	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cefazoline	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	5	5	6
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	4	4	5	5	6
	4	0	0	0	0	0	0	2	2	3	4	4	5	5	5	6
	6	0	0	0	0	0	1	3	3	3	4	4	5	5	5	6
	12	0	0	0	0	0	2	3	3	4	4	4	5	5	5	6
	24	0	0	0	0	1	3	4	4	4	4	5	5	5	5	6
Ceftriaxone	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	6
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	6
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	4	5	6
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	5	6
	12	0	0	0	0	0	0	1	1	3	4	4	4	5	5	6
	24	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	5	5	6	
ciprofloxacin	1	0	0	0	0	0	0	2	2	5	6					
	2	0	0	0	0	0	2	2	2	5	6					
	4	0	0	1	1	1	3	3	5	6						
	6	0	0	2	2	2	4	5	5	6						
	12	0	0	3	3	5	6									
	24	0	0	4	5	6										
Gentamicine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	6				
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	6				
	4	0	0	0	0	0	0	0	2	3	6					
	6	0	0	0	0	0	0	3	4	6						
	12	0	0	0	0	0	3	6								
	24	0	0	2	3	6										

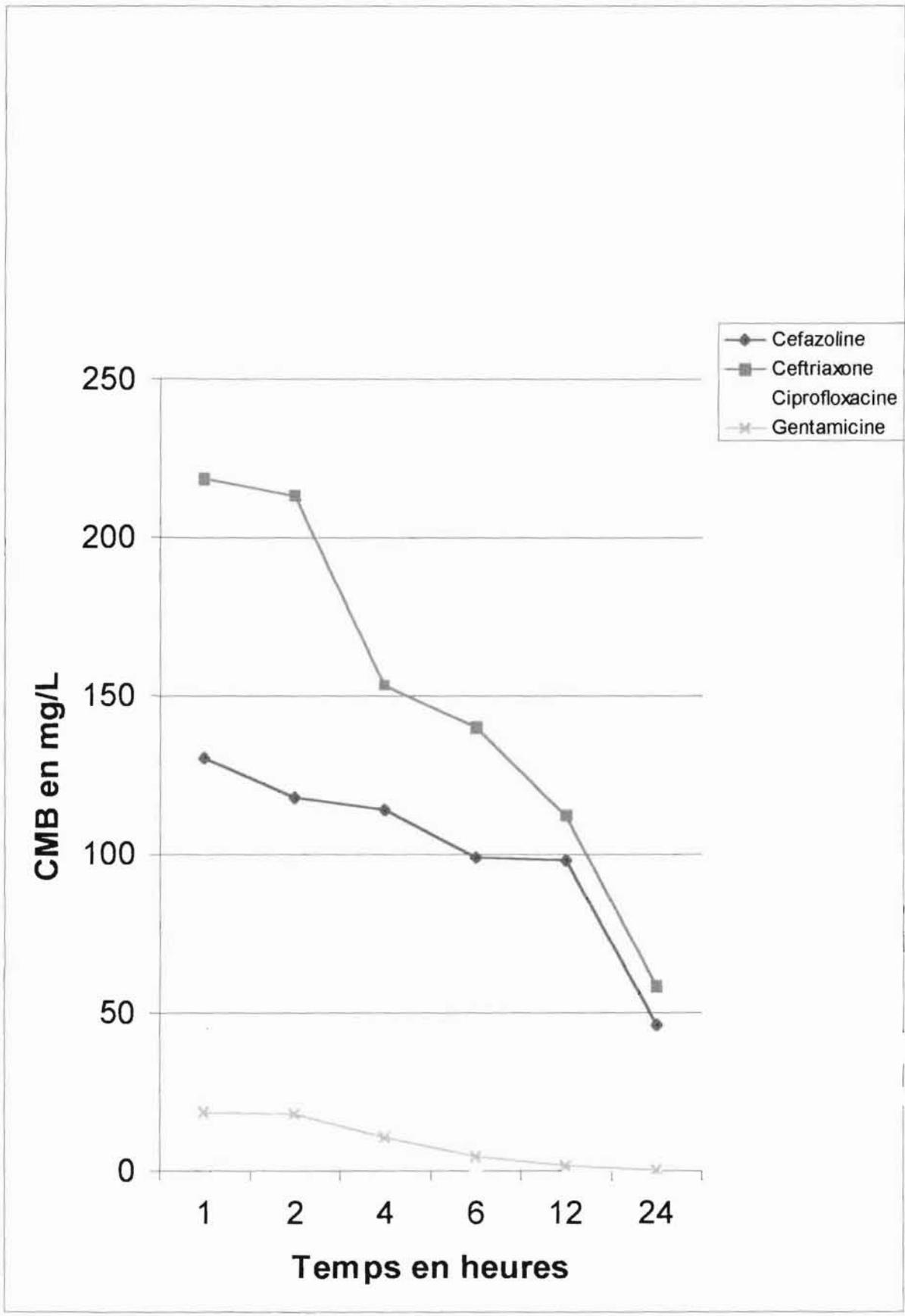


Figure 3 : Courbes de bactéricidie pour *Staphylococcus spp.*

### D. *Flavobacterium odoratum*

La ciprofloxacine montre une activité bactéricide très rapide avec tous les rapport CMB/CMI=1. Les CMI sont très basses elles sont toutes inférieures à 0,25 mg/l.

**Tableau XI :** Effectifs cumulés d'inhibition des souches de *Flavobacterium odoratum* par différentes concentrations d'antibiotiques.

CMI(mg/l)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cefazoline	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	4	5
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	4	5		
ciprofloxacine	0	0	0	2	5										
Gentamicine	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	4	5			

**Tableau XII :** Rapport CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches de *Flavobacterium odoratum*.

CMI/CMB	1	2	4	8	16	32
Cefazoline	2	3				
Ceftriaxone	4		1			
ciprofloxacine	5					
Gentamicine	3	1			1	

**Tableau XIII :** CMB 99,9% et cinétique de bactéricidie des différents antibiotiques testés sur les souches de *Flavobacterium odoratum* (effectifs cumulés de bactéricidie)

CMB (mg/l)	temps en heures	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cefazoline	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	5
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	5
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	3	5
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	5	
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	3	5
Ceftriaxone	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	5
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	5
	6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	5	
	12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	3	5	
	24	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4	4	5	
Ciprofloxacine	1	0	0	0	0	1	2	3	4	4	5					
	2	0	0	0	1	2	2	4	5							
	4	0	0	1	2	5										
	6	0	0	1	3	5										
	12	0	0	2	5											
	24	0	0	2	5											
Gentamicine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	3	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	5
	4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	3	3	4	5
	6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	3	3	3	5	
	12	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	3	3	4	5	
	24	0	0	0	0	2	2	2	2	2	3	4	4	4	5	

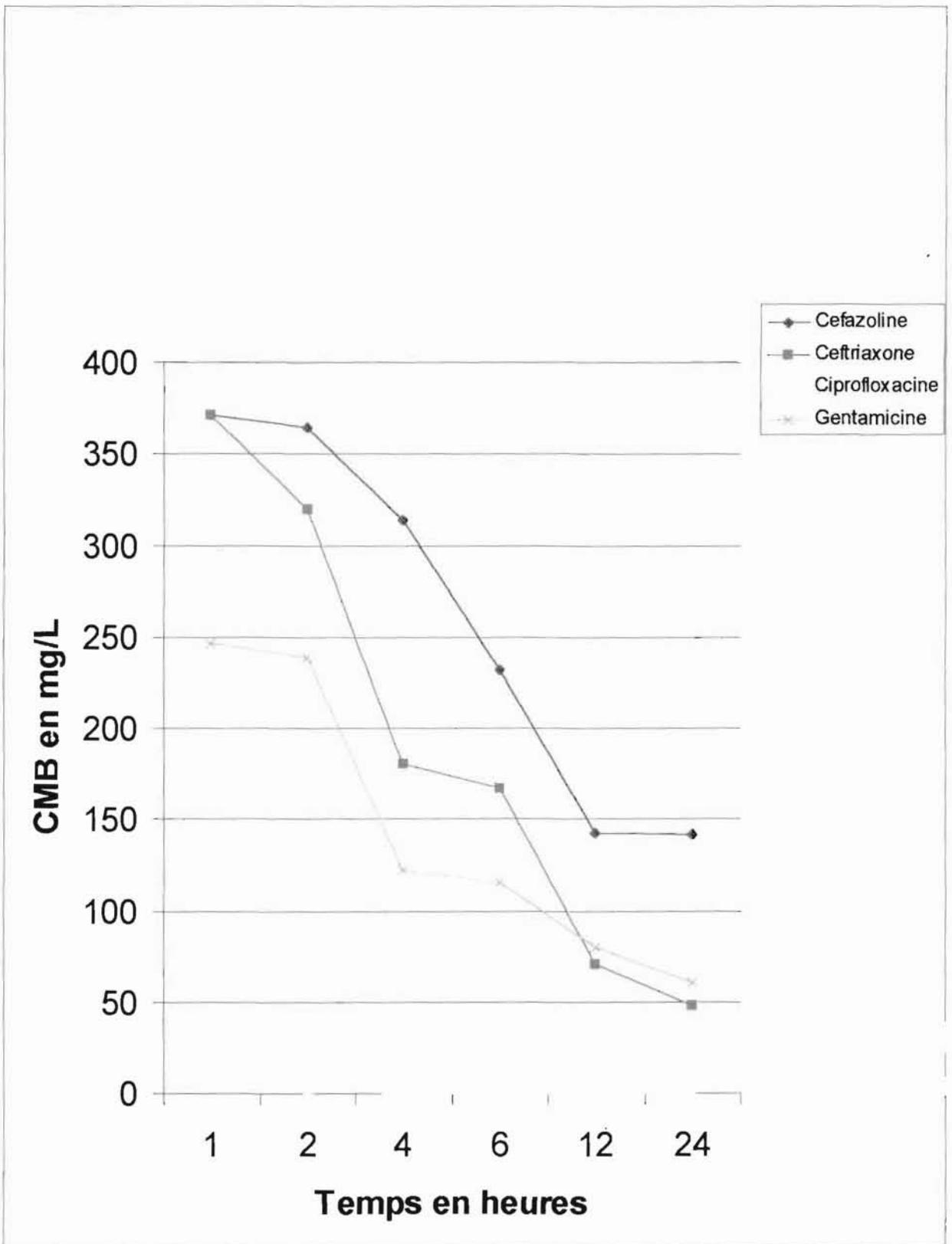


Figure 4 : Courbes de bactéricidie pour *Flavobacterium odoratum*.

### E. *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons voulu tester la cefatrizine, qui est un antibiotique utilisé en pédiatrie dans le traitement d'infections au bacille pyocyanique. Cependant nous nous sommes confronté à un problème technique car n'ayant pu trouver un solvant adéquat pour dissoudre la poudre de cefatrizine sous forme d'éther dont nous disposions.

La ciprofloxacine et la gentamicine ont donné une bactéricidie rapide avec des CMI basses. Les CMI de la ceftriaxone s'échelonnent entre 1 et 64 mg/l mais les CMB obtenues sont très élevées.

**Tableau XIV** : Effectifs cumulés d'inhibition des souches de *pseudomonas aeruginosa* par différentes concentrations d'antibiotiques.

CMI(mg/l)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0	1	2	4	5	7	9	11		
Ciprofloxacine	0	0	0	1	4	5	10	10	11	11	11	12			
Gentamicine	0	0	0	1	2	7	9	10	11	11	11	11	12		

**Tableau XV** : Rapport CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

CMI/CMB	1	2	4	8	16	32
Ceftriaxone	4		1			
Ciprofloxacine	5					
Gentamicine	3	1			1	

**Tableau XVI :** CMB 99,9% et cinétique de bactéricidie des différents antibiotiques testés sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* (effectifs cumulés de bactéricidie)

CMB (mg/l)	temps en heures	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Ceftriaxone	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	11
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	11
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	7	11
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	8	11
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	9	11
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	5	7	10	11
Ciprofloxacine	1	0	0	0	0	3	3	5	6	9	10	10	11	11	11	12
	2	0	0	0	1	3	4	5	8	10	10	11	11	11	11	12
	4	0	0	1	2	3	5	9	10	10	10	11	11	11	12	
	6	0	0	1	4	6	10	10	10	10	10	11	11	12		
	12	0	0	1	4	6	10	10	10	10	10	11	12			
	24	0	0	1	4	6	10	10	10	10	10	11	12			
Gentamicine	1	0	0	0	0	0	1	1	2	4	7	9	10	11	11	12
	2	0	0	0	1	1	1	2	5	6	8	9	10	11	11	12
	4	0	0	1	1	2	2	6	7	9	10	10	11	11	11	12
	6	0	0	1	1	3	5	8	9	10	10	11	11	11	11	12
	12	0	0	1	2	5	6	10	10	11	11	11	11	11	12	
	24	0	0	1	2	6	7	10	10	11	11	11	11	11	12	

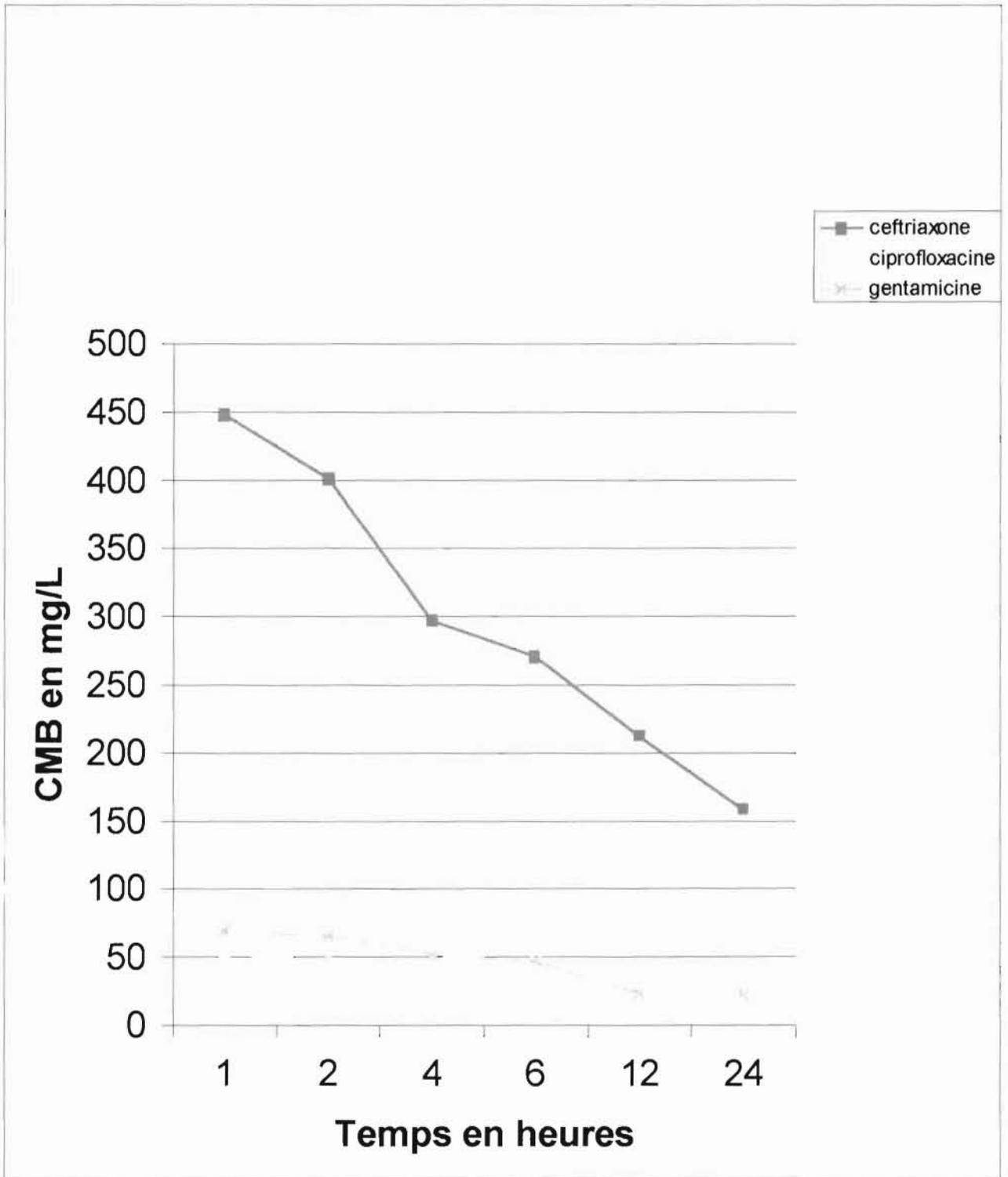


Figure 5 : Courbes de bactéricidie pour *Pseudomonas aeruginosa*.

# Discussion

## **V. DISCUSSION**

Le but de notre étude était d'étudier le comportement de différents antibiotiques sur des souches bactériennes isolées d'infections sévères. Les antibiotiques testés se sont révélés à l'antibiogramme pour l'essentiel efficaces sur les souches étudiées. Il s'est agi d'antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique pour ces types d'infections.

Ces épreuves de cinétique de bactéricidie ont été assez fastidieuses d'un point de vue technique. Elles ont toutefois eu le mérite de préciser ; le mode d'action bactéricide des antibiotiques (bactéricidie temps ou dose dépendante) ; de déterminer la CMI et la CMB, mais aussi de faire apparaître le comportement tolérant de certaines souches vis à vis d'antibiotiques. Ces données complètent les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques comme l'antibiogramme et permettent ainsi un meilleur réajustement du traitement par le thérapeute.

Les difficultés majeures dans les manipulations tiennent surtout à un bon calibrage des inocula bactériens à tester mais aussi à la rapidité requise dans les repiquages sur la gélose de dénombrement. La maîtrise de ces difficultés techniques nous a permis d'étudier la cinétique de bactéricidie de 44 souches avec pour chaque souche 3 à 4 antibiotiques testés sur une gamme de 15 concentrations.

### ***A. ACTIVITE BACTERICIDE DES BETALACTAMINES***

L'amoxicilline et deux céphalosporines ont été testés dans cette étude. Ces bêta-lactamines ont montré sur les souches sensibles une activité bactéricide de type « temps dépendant ». En effet sur l'essentiel des germes testés un temps de

contact supérieur à 6 heures à été généralement nécessaire pour obtenir par exemple une CMB de l'ordre de 4 fois la CMI. Cette bactéricidie temps dépendante est caractéristique des bêta-lactamines, elle à été largement décrite dans la littérature.(13, 49)

Six souches de pneumocoques sur les sept testées ont montré une CMI inférieure ou égale à 2mg/l, des résultats similaires sont retrouvés dans la littérature (17, 33 ).

L'activité est de type bactéricide strict ( $CMB/CMI = 1$  ou  $2$ ) pour cinq des germes alors que chez les deux autres on retrouve une action tolérante. L'une de ces souches tolérantes reste toutefois sensible avec une CMI à 1mg/l. Cette tolérance généralement liée à une mutation reflète chez ces souches, l'absence de la mise en jeu du système conduisant à la mort bactérienne alors que la sensibilité reste inchangée car l'activité bactériostatique de l'antibiotique liée à son affinité pour les PLP reste identique. *Moreillon et al* (16) ont montré dans l'une de leurs études que 32% des souches de pneumocoques sensibles à la pénicilline étaient tolérantes. Ces phénomènes de tolérance sont à surveiller car il a été montré chez les pneumocoques une corrélation positive entre résistance et tolérance. Aussi les souches tolérantes en elles-mêmes étaient moins efficacement éradiquées que les souches non tolérantes.

Sur les 14 souches de *Staphylococcus aureus* deux se sont montré résistantes à la ceftriaxone et la céfazoline. Il s'agit probablement de souches méthicilline résistantes qui sont typiquement hospitalières. Ces types de souches présentent une résistance croisée à toutes les bêta-lactamines. Cette résistance a été expliquée par certains auteurs par la présence, chez ces souches, d'une PLP surnuméraire (PLP2a) qui a une faible affinité pour toutes les bêta-lactamines.(10, 32)

Ndoye I (38) avait trouvé en 1993 dans notre laboratoire d'étude que 60% des S.A.R.M. étaient résistantes à la ceftriaxone.

Les CMI obtenues avec la ceftriaxone sont inférieures à celles de la cefazoline, cependant l'activité de la ceftriaxone a une tendance à être tolérante deux souches présentent d'ailleurs un rapport CMB/CMI = 32.

Il a été suggéré que la tolérance est une phase prédictive de la résistance (13, 24).

Une recroissance tardive a été obtenue pour deux souches entre la douzième et vingt quatrième heure.

Des souches de staphylocoques à coagulase négative ont été testées, en effet ces souches prennent une place de plus en plus importante dans les infections nosocomiales surtout chez les individus immunodéprimés.

Les performances de la ceftriaxone et de la céfazoline sur ces staphylocoques coagulase négative ont été meilleures que sur les souches *staphylococcus aureus*. Aucune résistance n'a été décelée, les CMI et CMB ont été plus basses, les rapports CMB/CMI sont beaucoup plus proches de 1 (elles sont toutes inférieures ou égales à 4. La meilleure sensibilité des staphylocoques coagulase négative vis à vis des souches de *staphylococcus aureus* a été décrite par *Bismuth et al.* (5)

La ceftriaxone et la céfazoline ont montré une activité bactéricide temps dépendante sur les souches de *flavobacterium odoratum*. La ceftriaxone reste toujours plus active, les CMI sont inférieures ou égales à 32 mg/l pour 4 des 5 souches testées.

Dix souches de *pseudomonas aeruginosa* sur les douze testées à la ceftriaxone ont donné de CMB 8 à 32 fois plus élevés que la CMI. Cette tolérance de *pseudomonas aeruginosa* aux bêta-lactamines a été retrouvée dans d'autres études (13). Mais il faut noter que cette bactéricidie est très lente et qu'elle peut se poursuivre au delà des vingt quatre heures. (14)

Les bêta-lactamines montrent dans l'ensemble pour les souches sensibles une activité bactéricide très nette pour les pneumocoques et flavobacterium.

Cette activité est moins nette pour les staphylocoques alors qu'elle a tendance à être de nature tolérante pour les souches de *Pseudomonas*.

D'un point de vue cinétique l'activité de ces bêta-lactamines est peu tributaire de la concentration ; elle est de nature temps dépendante et très lente pour les souches de *pseudomonas*. *Drugeon et Lambert (19, 29)* ont trouvé à la suite d'une étude menée sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* qu'aucune des bêta-lactamines de leurs tests n'était bactéricide en 6 heures pour des concentrations égales à 64 fois la CMI. Donc d'un point de vue pratique, la tendance des thérapeutes à augmenter les doses de bêta-lactamines pour faire face à des infections sévères n'est pas justifiée.

## **B. ACTIVITE BACTERICIDE DES MACROLIDES**

Les macrolides sont des antibiotiques considérées comme bactériostatiques. Nous les avons testés sur des souches de pneumocoques isolés d'infections respiratoires basses. Les CMI que nous avons obtenues sont très basses en accord avec les CMI déterminées par *Diouf F(15)* sur les mêmes souches en utilisant la méthode de diffusion en gélose.

Les CMI obtenues avec la clarithromycine sont plus basses que celles de la spiramycine et de l'érythromycine.

Les CMB obtenues ont été assez proches des CMI cependant ceci n'est pas à interpréter « forcément » comme une activité bactéricide de ces antibiotiques. Cette mortalité bactérienne pourrait être expliquée par la fragilité des pneumocoques qui peuvent être soumis in-vitro à une lyse spontanée modifiant les paramètres de bactéricidie ce phénomène a été suggéré par *Shanholtzer(45)*.

## C. ACTIVITE BACTERICIDE DE LA GENTAMICINE

La gentamicine a été testée sur les souches de Staphylocoques, de Flavobacterium et de Pseudomonas. Sur l'ensemble de ces souches l'activité bactéricide a été plus ou moins rapide.

Concernant les souches de *staphylococcus aureus*, 13 sur les 14 souches testées ont présentées des CMI inférieures ou égales à 4 mg/l cette bonne sensibilité est accompagnée d'une activité bactéricidie assez rapide avec atteinte de la CMB entre 6 et 12 heures en moyenne.

Les staphylocoques sont naturellement sensibles aux aminosides. Néanmoins, ces bactéries peuvent acquérir des enzymes modificateurs des aminosides (6). Il s'agit de transférases capables de dégrader les molécules d'aminosides. Ces enzymes de résistance sont généralement codés par des plasmides facilement transférables par conjugaison (35). Une enzyme peut ne pas conférer un phénotype apparent de résistance, c'est à dire que la souche paraîtra sensible à l'antibiogramme. Cependant si l'antibiotique conserve son activité bactériostatique, il a perdu une partie ou la totalité de son activité bactéricide. Chez l'une des souches, l'écart retrouvé entre la CMB qui est de 64 mg/l et sa CMI de 1 mg/l pourrait être lié à l'acquisition de ce type d'enzyme.

Chez les souches de staphylocoques à coagulase négative un même profil d'activité bactéricide à été retrouvé. Toutefois comme l'indique la littérature, les niveaux de sensibilité obtenus sont encore plus bas.(49, 5)

L'activité de la gentamicine sur les souches de Pseudomonas a été nettement bactéricide. Les CMI s'échelonnent entre 0,12 et 64 mg/l avec une modale située à 0,5mg/l. les CMB sont en général atteintes après 6 à 12 heures de contact. Les CMB de la gentamicine sur *Pseudomonas aeruginosa* obtenues lors de notre étude sont plus basses que celles de *Juvin et al.*(28) Cependant pour l'une des souches la CMB = 32mg/l alors que sa sensibilité est conservée (CMI = 0,5mg/l). ce type de concentrations élevé est difficile à obtenir *in-vivo*

avec la gentamicine. Ainsi donc l'éradication de ce type de souche peut se traduire au point de vue clinique par des difficultés thérapeutiques. Il pourrait alors être nécessaire une adaptation de la posologie avec augmentation des doses ou association avec d'autres antibiotiques.

Ce niveau de CMB très élevé a été retrouvé pour deux souches de *flavobacterium odoratum* avec toujours conservation de la sensibilité.

#### **D. ACTIVITE BACTERICIDE DE LA CIPROFLOXACINE.**

Sur l'ensemble des souches étudiées et qui ont été sensibles, la ciprofloxacine a de loin présenté le meilleur profil bactéricide. Il s'agit d'une bactéricidie rapidement atteinte. Les CMB obtenues ont été en général très proches des CMI : 1 à 2 fois la CMI confirmant les résultats de études de *Ndaw.*(37 )

Les CMB ont été atteintes au bout de 4 à 6 heures de contact pour les bacilles gram négatif, alors qu'elles l'ont été plus tardivement avec les staphylocoques (entre 6 et 12 heures).

Sur les souches de *Flavobactérium* et de *Pseudomonas*, la bactéricidie est nettement de type « concentration dépendante ». Une CMB inférieure ou égale à 1mg/l est atteinte au bout de 6 heures sur 10 des 12 souches de *Pseudomonas*.

L'une des souches de *Pseudomonas aeruginosa* testée s'est révélée résistante à la ciprofloxacine et aux autres antibiotiques. Les mécanismes de résistance au quinolones peuvent être liées à des mutations ponctuelles au niveau de l'ADN Gyrase bactérien (4, 53) ou à la baisse de la pénétration de l'antibiotique par un mécanisme d'efflux actif ou de diminution des porines.

En définitif il faut noter que la bactéricidie obtenue *in-vitro* n'est pas dans tous les cas superposables à celle obtenue *in-vivo*. En effet dans l'organisme interviennent des considérations pharmacocinétiques telles que la

biodisponibilité de l'antibiotique au niveau du foyer infectieux et d'autres liées aux capacités immunitaires du malade. Aussi les conditions physico-chimiques de détermination de l'activité bactéricide *in-vitro*, étant différentes de celles de l'organisme, peuvent modifier l'activité des antibiotiques (13).

Conclusion

## VI. CONCLUSION

Chez certains malades, l'apparition d'états où les processus de défense antibactériennes sont diminués ou abolis a conduit les cliniciens à rechercher l'emploi d'antibiotiques rigoureusement bactéricides. Donc d'antibiotiques dont les microbiologistes peuvent démontrer l'action létale sur les bactéries.

Ainsi au delà des études de sensibilité couramment réalisées en laboratoire, les études de la bactéricidie des antibiotiques peuvent s'avérer nécessaires pour une meilleure prise en charge thérapeutique des malades. C'est le cadre dans lequel s'est inscrit notre étude.

En effet, nous avons testé in vitro l'activité bactériostatique et bactéricide de huit antibiotiques : 3 macrolides (la clarithromycine, l'erythromycine et la spiramycine) ; de trois bêta-lactamines (l'amoxicilline, la ceftriaxone et la cefazoline) ; d'une aminoglycoside (la gentamicine) et d'une fluoroquinolone (la ciprofloxacine).

La méthode de microdilution sur microplaque a été utilisée. Elle a permis de tester un total de 44 souches réparties ainsi qu'il suit :

- 7 *Streptococcus pneumoniae*.
- 14 *Staphylococcus aureus*.
- 6 *Staphylococcus spp (coagulase négative)*.
- 5 *Flavobacterium odoratum*.
- 12 *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour ces souches ont été déterminées les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides. Mais aussi il a été suivi l'évolution de la bactéricidie des antibiotiques au cours du temps (cinétique de bactéricidie).

D'un point de vue technique, la réalisation de ces épreuves de bactéricidie a été assez fastidieuse.

Cependant de notre étude il ressort principalement que :

- ✓ Les bêta-lactamines ont montré, dans l'ensemble, sur les souches sensibles, une bonne activité bactéricide sur les pneumocoques. Cette activité a été moindre pour les staphylocoques avec quelque cas de tolérances. Ces phénomènes de tolérances ont été plus nettes et fréquentes avec les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité des céphalosporines sur les souches de *Flavobacterium odoratum* a été aussi bonne.
- ✓ Pour les macrolides des CMI très basses ont été retrouvées chez des souches de pneumocoques.
- ✓ La gentamicine s'est révélée être nettement bactéricide. Avec une bactéricidie de type dose dépendante. Les CMB ont été atteintes après 6 à 12 heures de contact. Des phénomènes de tolérance ou résistance se sont révélés avec des souches de staphylocoques et de pseudomonas.
- ✓ La ciprofloxacine s'est révélée comme l'antibiotique plus bactéricide de notre étude. En effet les seuils de bactériostase et de bactéricidie ont été très bas. Les CMB rapidement atteintes au bout de 6 heures étaient égales ou très proches des CMI.

Notre étude nous a aussi permis de voir que les antibiotiques peuvent présenter, au sein d'une même espèce bactérienne, des profils différents de bactéricidie. Ces profils peuvent varier de la bactéricidie parfaite à la résistance en passant par les phénomènes de tolérance. Une variabilité de la cinétique de bactéricidie des antibiotiques était aussi possible. Ainsi il serait difficile de manière probabiliste ou à partir uniquement du profil de sensibilité de présager de l'activité bactéricide d'un antibiotique sur une souche. D'où tout l'intérêt dans les infections sévères où une bactéricidie rapide et stricte est requise d'effectuer ces épreuves de bactéricidie.

L'intérêt clinique des résultats de cette étude est de permettre un abord plus facile de la pharmacodynamie des antibiotiques. Par exemple la notion de temps dépendance caractérisant la bactéricidie de certains antibiotiques remet en cause la tendance naturelle de certains thérapeutes à augmenter les doses dans le traitement des infections sévères. Une tendance du reste parfaitement justifiée lorsque l'activité de l'antibiotique est dose dépendante ( cas de la gentamicine dans notre étude).

Ces résultats peuvent suggérer l'usage d'une association synergique d'antibiotiques bactéricides pour venir à bout de certaines infections.

Au terme de notre étude il apparaît que face à un antibiotique donné, les souches d'une espèce bactérienne donnée sont susceptibles de comportements variables et que la bactéricidie reste un phénomène difficile à étudier. A cet égard, des techniques simplifiées devraient être standardisées pour permettre une réalisation aisée et fiable des études de bactéricidie dans la routine du laboratoire de bactériologie clinique. Des dispositifs techniques d'automatisation et de comptage des bactéries devraient aider en cela.

# Bibliographie

## VII. BIBLIOGRAPHIE

1. AFECT Traité de chimie thérapeutique. Vol 2 Médicaments antibiotiques. Paris :edition,1992 :499p.
2. BARRY A.L., FAY G.D. The amount of agar in antimicrobial disc susceptibility test plates. *Am. J. Clin. Path.* 1973;59: 196-198
3. BERGONE-BEREZIN.C. Antibiotiques antibactériens :classification, principes et règles d'utilisation. *Rev. Prat.*1998 ;48 :991-999.
4. BERT F., LAMBERT-ZECHOVSKY N. Current microbiological problems, antibiotic resistance and therapeutic problems raised by *Pseudomonas aeruginosa*. *Press. Med.*1999 ;28(8) :451-458.
5. BISMUTH R., CAILLON J. Staphylocoques. Dans : COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. et GOLDSTEIN F. Bactéricidie. Paris : Maloine, 1990 :187-211.
6. BISMUTH R. Mécanismes de résistance aux aminoglycosides. *La lettre de l'infect.* 1998 ;n°19-20 : 462-470
7. BUXERAUD J., COMBY. F. Antibiothérapie : classification des antibiotiques. *Actua. Pharma.* 1995 ;337 :35-41.
8. CAILLON J. L'activité bactéricide des antibiotiques développement de nouvelles méthodes automatiques et leurs applications dans l'étude des antibiotiques seuls ou associés. 238p.Th : microbiologie. Paris : 1990 ;n°153.
9. CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGES R. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : SIMEP SA. pp125-126.
10. CHAMBERS H.F. Methicillin resistant staphylococci. *Clin. Microb. Rev.* 1988;1:173-186.

11. CHAMPNEY W. S., BURDINE R. Azithromycin and clarithromycin inhibition of 50s ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cell. *Curr. Microbiol.* 1998;36(2):119-123.
12. CHAUBBERT Y.A. Les antibiotiques en bactériologie médicale. Dans : Daguët G.L. Techniques en bactériologie, volume 3, Paris, Flammarion Médecine Sciences, 1972 :143-242
13. COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. et GOLDSTEIN F. Bactéricidie. Paris : Maloine, 1990. 374 pp.
14. DESLISLE F., LESAGE D. *Pseudomonas aeruginosa*. Dans : COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. et GOLDSTEIN F. Bactéricidie. Paris : Maloine, 1990 :223-240.
15. DIOUF F. Macrolides, lincosamides, streptogramines, azalides et kétolides en thérapeutique anti-infectieuse (données bactériologiques). Thèse pharm. :Dakar, 2001, n°43
16. MOREILLON P., TOMAZ A. Penicillin resistance and detective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence of two kind of antibiotics pressure operating in the clinical environment. *J. Infect. Dis.* 1988 ;157 :1150-1157.
17. DELLAMONIRA P., PRADIER CH. Le pneumocoque : actualité intérêt de l'amoxicilline. *Med. Mal. Infect.* 1997 ;27 :740-741.
18. DRUGEON H.B., MAURISSET B., COURTIEU A.L. Bactéricidie des aminosides dans des systèmes statiques et dans un modèle dynamique. *Nouv. Press. Med.* 1979; 8: 3403-3407
19. DRUGEON H.B., CAILLON J., MOINARD D., JUVIN M.E. Activité bactéricide de la piperacilline seule ou associée. *Press. Med.* 1986 ;15 :2297-2302.

- 20.FERRON A. Classification, mécanismes d'action, spectre d'activité des antibiotiques. Bactériologie Médicale. Paris : éditions C et R, 1994 :1-11.
- 21.GOESSENS W.H.F.,FONTIJNE P, VANRAFFE M., MICHEL M.F.,  
Tolerance percentage as a criterion for the detection of tolerant *staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents chemother. 1984;25: 575-578.
- 22.GRASSO S. Historical review of in vitro models. J. antimicrob. Chemother. 1985. 15 suppl A: 99-102
- 23.GREENWOOD D., O'GRADY F. An in vitro model of urinary bladder. J. Antimicrob. Chemother. 1978; 4: 113-120
- 24.GUTMANN L., PIERRE J. Tolérance aux bêta-lactamines. Dans :  
COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P. et GOLDSTEIN F.  
Bactéricidie. Paris : Maloine, 1990 :183-186.
- 25.HANDWERGER, S., and A. TOMAZ. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev. Infect. Dis.1985; 7: 368-386.
- 26.HORNE D., TOMAZ A. PH dependent penicillin tolerance of groupe B streptococci. Antimicrob. Agents. Chemother. 1981; 20: 128-135
- 27.JOLY B. Données générales sur les antibiotiques. Paris :Edt Masson, 1990 :124p
- 28.JUVIN M.E., DRUGEON H.B., CAILLON J., PIRAULT J.L. Comparaison de l'activité bactéricide de trois aminosides :gentamicine, tobramicine, amikacine. Path. Biol. 1987 ;35 :461-465.
- 29.LAMBERT-ZECHOVSKY N., et al. Choix d'une association bêta-lactamines aminosides rapidement bactéricide dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation infantile. Path. Biol. 1986 ;34(7) :855-858.

30. LAURI D., THRUPP H.D. Susceptibility of antibiotics in liquid media In V. Lorian (ed), antibiotics in laboratory medicine, Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1990: 73-113.
31. LORIAN V. Antibiotics in laboratory medicine 2th ed. London : Williams and Wilkins, Baltimore, .1986
32. MALAN C. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Concours Méd.;1996 :118 :p440.
33. MICHALAUT A. données bactériologiques et épidémiologique pour *Streptococcus pneumoniae* à l'hôpital sud de la Réunion. Bul. Soc Pathol. Exotiq. 2000;93:281-286.
34. MONTEIL H. Résistance bactérienne et antibiotiques. Med. Mal. Infect. ;1995:25:9-19.
35. MOULIN M. Pharmacologie. 1998 Ed Masson Paris.
36. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Fourth edition approved standard. 1997. NCCLS document M7-A4, Vol 17 n°2.
37. NDAW D. A. A. Activité bactéricide in vitro de différentes molécules d'antibiotiques sur des souches bactériennes d'origine hospitalière. Thèse pharm. :Dakar,1998,n°38
38. NDOYE I. Evaluation de l'activité bactéricide des différents antibiotiques isolés ou en association sur des souches bactériennes isolée au CHU de Dakar. Thèse pharm. :Dakar,1993 ;n°84
39. O'GRADY f., PENNINGTON J.H. Bactericidal growth in an in vitro simulating conditions in the urinary bladder. British Journal of Experimental Pathology.1966;47: 152-157.
40. PIERRE J.,GUTMANN L. Bases biochimiques et génétiques de la résistance aux bêta-lactamines chez les staphylocoques. Lettre infect. 1988 ;19 :734-740.

41. PLESIAT P., RAMOS-AIRES J., PECHER J., KOTTLER T. Systèmes d'efflux chez *Pseudomonas*. *Med Mal. Infect.* 1998 ;28 spé :126-133.
42. RAPHENON G. mécanismes de résistances des bactéries aux antibiotiques. *Forum médical* ;1996 :6-12.
43. ROLINSON G. M. Beta-lactamase induction and resistance to betalactamins. *J. Antimicrob. Chemother.* ;1989 :23 :1-5.
44. SANFILIPPO A., MORVILLO E.. An experimental model for the study of the antibacterial activity of the sulfonamides. *Chemotherapy.* 1968;13: 54-60.
45. SHANHOLTZER C.J., PETERSON L. R. False susceptible penicillin G MICs for *Streptococcus pneumoniae* with a commercial microdilution system. *Amer. J. Clin. Pathol.* 1986;85:626-629.
46. SOREN L., NILSSON L. Regrowth of aminoglycoside-resistant variants and its possible implication for determination of MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;26: 501-506.
47. TALOR P.C., SCOENKNECHT F.D., SHERRIS J.C., LINNER E.C. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: influence and significance of technical factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983 ; 23: 142-150.
48. TERRIER C. , HANSEN W., RENAUD F., FRENEY J. *Pseudomonas*. *Lyon Phar.* 1989;40(4) :259-268.
49. THABAUT A., MEYRAN M. Activité bactéricide comparée de quatorze antibiotiques sur *Staphylococcus aureus* .*Path-Biol.* 1989 ;37 :321-328
50. THABAUT, A., MEYRAN M. La détermination de la concentration minimale bactéricide : influence de différents facteurs techniques. *Path. Biol.* 1984 ; 32 :351-354
51. VIDAL 2001. Edition du Vidal. 77<sup>ème</sup> édition.

52. WENGLARCIK J.S., BLAIR L.L, DUNKLE L.M. PH depend oxacillin tolerance *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983 ; 2: 232-235.
53. YOSHIDA H., BOGAKI M., NAKAMURA M., NAKAMURA S. Quinolone resistance determining in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Chemother.* 1990;34:755-758.